

R O Z P R A W A D O K T O R S K A

Jan A. Litwin

/Zakład Histologii Instytutu Biologiczno-Morfologicznego
Akademii Medycznej w Krakowie/

HISTOCHEMICZNA LOKALIZACJA SYNTETAZY PROSTAGLANDYN
PRZY UŻYCIU 3,3'-DWUAMINO BENZYDYN
OCENA METODY

Bibl. Medyczna CM UJ

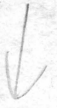


1816103881

Kraków 1976

Składam wyrazy głębokiej wdzięczności
Panu Docentowi Dr. hab. Tadeuszowi Cichockiemu
za nieprzerwaną opiekę i pomoc w trakcie
wykonywania pracy.

promotor



Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi
Dr. hab. Ryszardowi J. Gryglewskiemu
za cenne dyskusje oraz za udostępnienie
szeregu istotnych odczynników.

A u t o r

SPIS TREŚCI

	str.
Wstęp	1
Cele i założenia pracy	7
Materiał i metody	8
Wyniki	12
Dyskusja	25
Wnioski	40
Streszczenie	42
Piśmiennictwo	44
Ilustracje	56

WSTĘP

Prostaglandyny stały się w latach sześćdziesiątych jednym z centralnych obiektów zainteresowania biochemików, fizjologów i farmakologów. Te biologicznie czynne pochodne 20-węglowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, których działanie zostało po raz pierwszy opisane przez Von Eulera już w latach trzydziestych, odgrywają, jak się okazało, istotną rolę w zaskakująco szerokim wachlarzu procesów biologicznych. Tak wszechstronne działanie prostaglandyn wzbudziło szczególne zainteresowanie tymi substancjami, a intensywne, szerokie badania prowadzone przez okres ostatnich 15 lat pozwoliły wyjaśnić wiele problemów dotyczących biosyntezy prostaglandyn, ich metabolizmu i wydalania, funkcji na poziomie komórek i narządów oraz zastosowania w eksperymentalnej i praktycznej medycynie /38, 46, 107, 110/.

Wśród dosłownie tysięcy prac o charakterze biochemicznym, fizjologicznym czy też farmakologicznym rzuca się w oczy zaskakująco skąpa ilość informacji dotyczących cyto- i histochemii prostaglandyn, a zatem informacji o lokalizacji i rozmieszczeniu tych związków - tak w aspekcie jakościowym, jak i ilościowym - w poszczególnych komórkach i strukturach tkankowych. Niedostatek ten można przypisać trudnościom metodycznym wynikającym z następujących przesłanek:

- 1/ prostaglandyny wywierają swe działanie pojawiając się w komórkach w niesłychanie małych ilościach, rzędu nanogramów /44/;
- 2/ nie są one w tkankach gromadzone, a ich uwolnienie pod wpływem określonego bodźca jest wynikiem biosyntezy *in situ*: /38/.

Tak więc ich wykrycie i uwidocznienie za pomocą specyficznej reakcji histochemicznej jest już z teoretycznego punktu widzenia bardzo trudne.

Przegląd metod cyto- i histochemicznych dostępnych w badaniu prostaglandyn należałoby zacząć od studiów nad rozmieszczeniem w poszczególnych tkankach i narządach prostaglandyn znakowanych, egzogennych, które po wychwyceniu przez określone formacje komórkowe były następnie uwidaczniane na drodze autoradiografii /35, 51, 64, 85, 86/.

Podjęto również próby lokalizacji immunohistochemicznej receptorów prostaglandynowych na błonie komórkowej plemników, korzystając ze swoistych przeciwciał anty-PGA₂/PGE sprzężonych z ferrytyną /4/.

Nissen /67, 68, 69, 72/ łączył lokalizację i dynamikę wydzielania prostaglandyn w rdzeniu nerki z obecnością i zachowaniem się kropli lipidowych w komórkach śródmiaższowych, w których to kroplach wykazano znamienne wysokie ilości prekursorowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Pogląd ten podtrzymywany był również w kilku innych pracach /14, 56, 61, 65/.

Kolejna grupa prac dotyczyła histochemicznej identyfikacji enzymów biorących udział w biosyntezie i metabolizmie prostaglandyn.

Wykorzystując reakcję redukcji soli tetrazolowych Nissen i Andersson opisali metodę lokalizacji aktywności dehydrogenazy kwasu 15-hydroksyprostanowego /PGDH/, jednego z kluczowych enzymów systemu inaktywacji prostaglandyn w tkankach /70, 71/. Jako substratu użyto prostaglandyn szeregu E. Badania przeprowadzone na nerce szczura wykazały najsilniejszą

aktywność enzymu w komórkach ramienia wstępującego pętli Henlego oraz w ścianach tętniczek kory, co pozostawało w zgodności z wynikami eksperymentów biochemicznych lokalizujących przeważającą część aktywności tego enzymu na terenie kory nerki /3, 52/. Ta sama metoda histochemiczna posłużyła Sigginsowi /100/ do badań nad mózgiem szczura. Wykazał on szczególną aktywność PGDH w perikarionach komórek Purkiniego i neuronów warstwy molekularnej w korze mózdzku.

Znikome ilości prostaglandyn endogennych obecnych w tkankach i istotna rola biosyntezy tych związków in situ we wszystkich procesach związanych z ich oddziaływaniem przemawiają przeciwko próbom histochemicznego uchwycenia samych prostaglandyn, stawiając jako znacznie korzystniejszą alternatywę możliwość cyto- i histochemicznej lokalizacji systemu enzymatycznego odpowiedzialnego za ich biosyntezę, a nazywanego zbiorczo syntetazą prostaglandyn, którego rozmieszczenie i aktywność jest najbardziej adekwatnym i precyzyjnym odzwierciedleniem procesu uwalniania prostaglandyn, a w połączeniu z umiejscowieniem aktywności dehydrogenazy prostaglandyn w danym narządzie stwarza możliwość histochemicznego prześledzenia całego metabolizmu tych związków.

Syntetaza prostaglandyn to szereg nie dość dokładnie jeszcze poznanych i wyodrębnionych enzymów, przekształcających wielonienasycone 20-węglowe kwasy tłuszczowe uwolnione na skutek działania fosfolipazy A na fosfolipidy błon komórkowych /47/ w specyficzne jednokarboksylowe hydroksykwasy zawierające pierścień cyklopentanowy i zmienną ilość wiązań nienasyconych. Proces ten wymaga tlenu atmosferycznego oraz kofaktorów będących donatorami elektronów, jak np. zredukowanego glutationu,

kwasy tetrahydrofoliowe, hydrochinonu lub amin biogennych /80, 96, 101/. Reakcją inicjującą, której szybkość warunkuje szybkość całej biosyntezy jest stereospecyficzna dehydrogenacja przy C-13 z wytworzeniem grupy nadtlenkowej przy C-11 /49, 58/. Następnie, na drodze skomplikowanych wewnętrznych przemian z cyklizacją nadtlenku przy C-9 - C-11, przyłączeniem atomu tlenu do C-15, izomeryzacją podwójnego wiązania i wytworzeniem pierścienia węglowego przez połączenie C-8 z C-12 powstaje biologicznie czynny prekursor prostaglandyny o charakterze cyklicznego nadtlenku kwasu tłuszczowego /31/. Pierwszy etap tych przemian katalizowany jest przez enzym o charakterze dioksygenazy /cyklooksygenazy/, którego inhibitorami są m.in. indometacyna i kwas acetylosalicylowy /58, 102/. Przemiana nadtlenku w cząsteczkę prostaglandyny zachodzi przy udziale dalszych dwóch enzymów: izomerazy, katalizującej powstawanie prostaglandyn szeregu E i reduktazy odpowiedzialnej za tworzenie prostaglandyn szeregu F /31, 49, 58, 111/.

Biochemiczne badania aktywności syntetazy prostaglandyn w poszczególnych frakcjach subkomórkowych wykazały ścisły związek tego systemu enzymatycznego z frakcją mikrosomalną, odpowiadającą głównie błonom siateczki endoplazmatycznej /2, 6, 7, 83, 105, 112/.

Jedyną opisaną dotychczas metodą histochemicznego wykrywania aktywności syntetazy prostaglandyn jest metoda pośrednia Janszena i Nugterena /42/ opierająca się na przejściowym powstawaniu w czasie biosyntezy prostaglandyn silnie reaktywnych grup chemicznych o charakterze nadtlenków /przy C-11 i C-15/. Metoda ta wykorzystując w charakterze substratu

prekursory prostaglandyn: wielonienasycone kwasy tłuszczowe /w oryginalnej pracy kwas dihomolinolenowy/, na w założeniu wykrywać właśnie owe ugrupowania, których pojawienie się pociąga za sobą utlenienie specjalnie dodanego donatora elektronów do barwnego, nierozpuszczalnego strątu. KCN w stężeniu $10^{-3}M$ hamuje mitochondrialne procesy oksydacyjno-redukcyjne oraz utlenianie katalizowane przez grupy hemowe hemoglobiny erytrocytów, natomiast nie wpływa na aktywność syntetazy prostaglandyn /105/, pozostawiając możliwość generacji nadtlenków zdolnych do reagowania z donatorem elektronów. Zastosowanym donatorem elektronów była 3,3'-dwaaminobenzzydina. /DAB/.

3,3'-dwaaminobenzzydina została wprowadzona do histochemii przez Grahama i Karnovsky'ego /27/ którzy po raz pierwszy użyli tego związku do wykrywania aktywności egzogennej peroksydazy chrzamu podanej do krążenia, a następnie śledzonej podczas absorbcji w kanalikach głównych nerek. W obecności H_2O_2 peroksydaza katalizowała utlenienie DAB z formy bezbarwnej do brązowego strątu, który potraktowany czterotlenkiem osmu przekształcał się w tzw. czeni osmową, tworząc bardzo drobny, elektronowo gęsty precypitat dobrze widoczny w mikroskopie elektronowym. Od tego czasu DAB znalazła cały szereg zastosowań w histo- i cytochemii.

Jako marker egzogennej peroksydazy i cytochromu c była używana do śledzenia procesów absorbcji i przepuszczalności w komórkach i tkankach /28, 45, 104/.

W metodach immunohistochemicznych wykrywano na tej drodze egzogenną peroksydazę sprzężoną ze swoistym przeciwciałem przeciwko antygenowi, którego lokalizacja była przedmiotem

badań /60, 104/.

Poprzez umiejscowienie aktywności endogennych peroksydaz /74/ oraz peroksydazowej aktywności katalazy stworzono metody uwidaczniania niektórych organelli komórkowych, dla których katalaza i peroksydazy były swoistymi enzymami, np. peroksyosomów /5, 76/, czy mikroperoksyosomów /77/.

Selignan i wsp. /99/ zastosowali DAB do wykrywania aktywności oksydazy cytochromowej, enzymu typowego dla mitochondriów. W reakcji tej DAB utleniana była bezpośrednio przez cytochrom c. Novikoff i Goldfischer /76/ opisali metodę nieenzymatycznego utleniania DAB przez cytochromy c i b_5 w mitochondriach.

Nieenzymatyczne wiązanie utlenionej DAB przez hemoproteidy /39, 40/ posłużyło jako jedna z metod wykrywania hemoglobiny /40/ oraz mioglobiny /25/. Opisano również fotooksydację DAB w lamellach chloroplastów /66/ i nieenzymatyczne utlenianie DAB przez noradrenalinę i melaninę /75/ oraz lipofuscyny /26/.

W reakcjach z żelazocyjankiem miedzi /brązem Hachetta/ powstającym w wyniku działania szeregu enzymów /kwasna fosfataza, esterazy, dehydrogenazy/ DAB przyłącza się z jednej strony do żelazocyjanku, z drugiej zaś wiąże osm tworząc w miejscu reakcji stręt uchwytany zarówno w mikroskopie optycznym, jak i elektronowym /34/.

Wykorzystując swoiste łączenie się DAB i grup siarczanowych, system DAB-czterotlenek osmu wykorzystano do wykrywania zarówno grup siarczanowych /8/, jak i sulfonowanych mukopolisacharydów /59/.

Histochemiczne podstawy zastosowania DAB i jej szerokie wykorzystanie do wykrywania szeregu enzymów zwracają uwagę

na szczególną istotność warunków zapewniających specyficzną reakcję w przypadku prób lokalizacji syntetazy prostaglandyn. Teoretyczne założenia metody Janszena i Nugterena /42/ nie wyjaśniają dokładnie mechanizmu utleniania DAB przez produkty pośrednie biosyntezy prostaglandyn i pozostawiają otwartą kwestię udziału w tej reakcji histochemicznej enzymów - czy to systemu syntetazy, czy też innych /oksydaz, peroksydaz/. Co więcej, atrakcyjna w aspekcie całokształtu badań nad prostaglandynami metoda nie została w latach 1974-1975 prawie zupełnie wykorzystana: poza doniesieniem o rozmieszczeniu syntetazy prostaglandyn w drogach moczowych kilku wybranych ssaków /43/ w specjalistycznej literaturze nie ukazała się, zgodnie z wiedzą autora, żadna publikacja poświęcona histochemii procesu biosyntezy prostaglandyn.

CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

Taki stan rzeczy, a także wyniki prób zastosowania metody Janszena i Nugterena w Zakładzie Histologii IIM AM w Krakowie stały się bodźcem do możliwie wszechstronnej analizy metody lokalizacji syntetazy prostaglandyn przy użyciu DAB i oceny jej czułości i swoistości, a co za tym idzie przydatności w badaniach cyto- i histochemicznych.

MATERIAŁ I METODY

I. Materiał tkankowy.

Do badań wykorzystano narządy pobrane od następujących zwierząt:

1. Tryk: pęcherzyki nasienne.
2. Buhaj: pęcherzyki nasienne.
3. Królik: pęcherzyki nasienne, nerka, nadnercza, błona śluzowa żołądka, jelito cienkie, wątroba, śledziona, m. sercowy, m. szkieletowy, tarczycy, jądro, płuco, ślinianki, skóra.
4. Szczur: pęcherzyki nasienne, nerka, wątroba, jelito cienkie, m. sercowy, oko, mózg.

II. Pobieranie materiału.

W przypadku tryka i buhaja materiał pobierano z rzeźni, starając się, aby czas pomiędzy zabiciem zwierzęcia a pobraniem materiału był jak najkrótszy. Króliki i szczury zabijano w laboratorium poprzez dożylne wstrzyknięcie powietrza /króliki/ oraz dekapitację /szczury/, bez użycia narkozy. Materiał pobierano natychmiast.

III. Utrwalanie.

A. Mikroskop optyczny. Zastosowano dwie zasadnicze procedury:

1. Materiał nieutrwalony zamrażano w ciekłym azocie, a następnie w tym samym dniu skrawano na kriostacie. Skrawki utrwalano bądź przed przeprowadzeniem reakcji histochemicznych, bądź też reakcje wykonywano na skrawkach nieutrwalonych, które utrwalano dopiero po inkubacji i po wypłukaniu płynu inkubacyjnego.

Do utrwalania wykorzystano: 5% roztwór wodny aldehydu

glutarowego /30 s - 5 min/; formol-Ca /1 - 5 min/;
metanol absolutny /1 - 5 min/; 100% aceton oraz 50% aceton w buforze 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 /1 min/.

2. Po pobraniu materiał utrwalano przez 1 - 24 h w 4% zdepolimeryzowanym paraformaldehynie w 0,1 M buforze fosforanowym pH 7,4; lub w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w w/w buforze; płukano w tym samym buforze z dodatkiem 7,5% sacharozy przez 18 - 24 h, a następnie zamrażano w ciekłym azocie i skrawano na kriostacie. Tak sporządzonych skrawków ponownie nie utrwalano.

B. Mikroskop elektronowy. Reakcje histochemiczne przeprowadzano na tkankach zarówno utrwalonych jak i nieutrwalonych.

1. W pierwszym przypadku natychmiast po zabiciu zwierzęcia narząd in situ polewano 2,5% roztworem aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,4, lub 4% zdepolimeryzowanym paraformaldehydem w tym samym buforze, a następnie w płytce Petry'ego wypełnionej utrwalaczem wykrawano z wybranych obszarów tkanki bloczki 1 x 1 mm, które utrwalano przez 1 h, płukano w buforze fosforanowym z dodatkiem 7,5% sacharozy przez 18 - 24 h. Część materiału zamrażano w ciekłym azocie.
2. W przypadku materiału nieutrwalonego inkubacje przeprowadzano na bloczkach wielkości 1 x 1 mm lub na skrawkach kriostatowych grubości 60 μ m. W części eksperymentów stosowano krioprotekcję przez zanurzenie bloczków tkankowych do 10% roztworu dwumetylosulfotlenku /DMSO/ przed zamrożeniem w ciekłym azocie. Po wypłukaniu płynu inkubacyjnego buforem fosforanowym z dodatkiem 7,5% sacharozy materiał utrwalano w 2,5% aldehydzie glutarowym

przez 1 h oraz w 1% OsO_4 przez 1 h, odwadniano we wzrastających stężeniach acetonu i tlenku propylenu i zataplano w Eponie 812.

IV. Skrawanie materiału.

A. Mikroskop optyczny. Skrawki o grubości $7\text{ }\mu\text{m}$ krojono na kriostacie SLEE w temperaturze -20°C , naklejano na szkiełka nakrywkowe, suszono na powietrzu przez 1-2 min a następnie poddawano dalszym procedurom.

B. Mikroskop elektronowy. Skrawki grubości ok. $700\text{ }\text{\AA}$ /jasno-złota barwa interferencyjna/ krojono na ultramikrotomie LKB 4800 oraz Porter-Blum. Dla kontroli całej powierzchni bloczka wykonywano skrawki półcienkie o grubości ok. $1\text{ }\mu\text{m}$, które oglądano w mikroskopie optycznym.

Do badań ultrastrukturalnych użyto mikroskopu elektronowego Tesla BS 500.

V. Reakcje histochemiczne.

1. Reakcja wykrywająca aktywność syntetazy prostaglandyn. Skład płynu inkubacyjnego wg Janszena i Nugterena /42/: kwas arachidonowy: 0,4 mg; DAB: 2 mg; KCN: 0,65 mg; bufor 0,2 M Tris/HCl, pH 8,0: 10 ml.

W badaniach stosowano chlorowodorek DAB /Fluka/ oraz DAB /Sigma/. Przebadano szereg wariantów płynu inkubacyjnego /p. wyniki/.

2. Reakcje uzupełniające. W doświadczeniach uzupełniających wykorzystane zostały również następujące reakcje histochemiczne wykorzystujące DAB:

- a/ reakcja wykrywająca aktywność endogennych peroksydaz wg Novikoffa i wsp. /74/;
- b/ reakcja wykazująca peroksysomy wg. Novikoffa i Goldfischera /76/;
- c/ reakcja wykrywająca aktywność oksydazy cytochromowej wg. Seligmana i wsp. /99/;
- d/ reakcja lokalizująca cytochromy c i b_5 wg Novikoffa i Goldfischera /76/;
- e/ reakcja z utlenioną DAB wykrywająca białka hemowe wg Hirai /40/.

3. Reakcje kontrolne:

- a/ inkubacja w płynie nie zawierającym swoistego substratu;
- b/ inkubacja po 5-minutowym zagotowaniu skrawków;
- c/ inkubacja w obecności "fałszywego" substratu /wykorzystano: kwas palmitynowy, kwas stearynowy, kwas olejowy, kwas linolowy, kwas linolenowy; kwasy tłuszczowe przeprowadzano w rozpuszczalne w wodzie sole sodowe przy pomocy NaOH lub Na_2SO_4 /; nad-tlenek wodoru/;
- d/ inkubacja w obecności inhibitorów /stosowano: indometacynę, kwas mefenamowy, kwas acetylosalicylowy, cyjanek potasu, fluorek sodu, azydek sodu, aminotriazol/;
- e/ inkubacja w obecności katalazy /dla wyeliminowania aktywności peroksydazowej zależnej od H_2O_2 /.

WYNIKI

A. Mikroskop optyczny

Uzyskane wyniki reakcji na aktywność syntetazy prostaglandyn wykonanej ściśle wg formuły podanej przez Janszena i Nugterena /42/ nie były zgodne zarówno z oryginalnymi rezultatami autorów, jak i z lokalizacją badanego systemu enzymatycznego wykazywaną w doświadczeniach biochemicznych. Produkt reakcji obecny był w znacznych ilościach w narządach, w których nie wykazano ilościowo znamiennej produkcji prostaglandyn /kora nerki, mięsień sercowy/; co więcej, reakcja zachodziła również w skrawkach kontrolnych, przy nieobecności swoistego dla biosyntezy prostaglandyn substratu - kwasu arachidonowego.

W tych warunkach zarysowała się konieczność dokładniejszego przebadania powyższej reakcji nieswoistej i ustalenia warunków niezbędnych do jej eliminacji.

I. Reakcja nieswoista - występująca w nieobecności kwasu arachidonowego.

Z doświadczeń wstępnych wynikało, że reakcja ta zachodzi przy zastosowaniu prostego płynu inkubacyjnego zawierającego DAB w buforze, przy czym wykorzystywane są substraty endogenne obecne w tkance. W tkankach silnie aktywnych intensywna reakcja zachodziła już po upływie 30 min inkubacji.

1. Lokalizacja aktywności.

Tkanki przebadane wymieniono w rozdziale "Materiał i metody". Oznaczenie symboli: +: reakcja na granicy uchwytności optycznej; ++: reakcja słaba; +++: reakcja intensywna; ++++: reakcja wybitnie intensywna.

- a/ nerka /królik, szczur/: kanalik główny /+++/ , ramię szerokie pętli Henlego i wstawka /++++/ /Ryc. 1a/, niektóre komórki cewek zbiorczych /++/ /Ryc. 1b/;
- b/ m. sercowy /królik, szczur/: pozytywnie reagujące ziarnistości ułożone w postaci kolumn równoległych do długiej osi włókien /++++/ /Ryc. 2/;
- c/ błona śluzowa żołądka /królik, szczur/: komórki okładzinowe, reakcja ziarnista /++++/ /Ryc. 3/;
- d/ tarczyca /królik/: komórki okołopęcherzykowe /+/;
- e/ oko /szczur/: mięśnie oczne, lokalizacja podobna jak w mięśniu sercowym /+++/ , widoczny różny stopień reaktywności włókien mięśniowych /Ryc. 4/;
- f/ centralny system nerwowy /szczur/: niektóre neurony w jądrach podkorowych /+/, komórki Purkiniego /+/;
- g/ granulocyty w obrębie szeregu narządów /jelita, płuca, nerka, skóra/, reakcja ziarnista /++/.

Pozostałe narządy i struktury tkankowe spośród przebadanych nie wykazywały reakcji pozytywnej.

2. Wpływ wysokiej temperatury na reakcję.

Po zagotowaniu skrawków przez okres 5 min reakcja nie występowała. Ogrzewanie wysuszonych skrawków w powietrzu do temperatury 100°C przez okres 10 min spowodowało znaczne osłabienie reakcji, jednak nie uzyskano jej całkowitego zahamowania. Przy analogicznym ogrzewaniu suchych skrawków w temperaturze 80°C przez 10 min reakcja występowała w pełnym natężeniu.

3. Wpływ pH płynu inkubacyjnego.

Przetestowano płyny inkubacyjne o pH od 0,75 do 10,2. Typowa reakcja pozytywna zachodzi w przedziale pH 5,4 - 9,8, uzyskując najwyższą intensywność w pH 6,5 - 7,5.

4. Wpływ stężenia DAB-HCl w płynie inkubacyjnym.

Stężenie minimalne wystarczające do wystąpienia optycznie uchwytnej reakcji przy czasie inkubacji 2 h 30 min wynosi 0,05 mg DAB-HCl/ml, stężenie optymalne: 0,5 mg DAB-HCl/ml. Zwiększenie stężenia DAB-HCl powyżej 1 mg/ml nie powoduje wzrostu intensywności reakcji.

5. Wpływ utrwalania.

a/ utrwalanie fragmentu tkanki przed jej skrojeniem /badano fragmenty wielkości 1 x 1 mm, czas utrwalania 1 h/:

- 4% zdepolimeryzowany paraformaldehyd, formol-Ca: powodują nieznaczne osłabienie reakcji;
- 2,5% aldehyd glutarowy: zapobiega wystąpieniu reakcji;

b/ utrwalanie skrawków przed inkubacją /czas utrwalania 5 min/:

- metanol absolutny oraz 2,5% aldehyd glutarowy zapobiegają wystąpieniu reakcji;
- 100% aceton, 50% aceton w buforze 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 4% zdepolimeryzowany paraformaldehyd oraz formol-Ca wywoływały nieznaczne osłabienie reakcji przy równoczesnym wzmocnieniu kontrastu pomiędzy elementami silniej i słabiej reagującymi.

Należy zaznaczyć, że granulocyty reagowały pozytywnie niezależnie od rodzaju utrwalania.

6. Wpływ inhibitorów obecnych w płynie inkubacyjnym.

a/ KCN: w stężeniu 5 mM całkowicie hamuje reakcję /Ryc. 5b/.

Przeprowadzono szereg doświadczeń zmierzających do ustalenia wpływu KCN na reakcję w zależności od stężenia inhibitora i czasu trwania reakcji. Wykazano, że przy czasie inkubacji 30 min minimalne stężenie KCN wystarczające do zupełnego zahamowania reakcji wynosiło 1 mM, natomiast przy czasie inkubacji 2 h 30 min /zalecany dla wykrywania syntetazy prostaglandyn/ konieczne okazało się stężenie 5 mM;

b/ azyd sodu $/\text{NaN}_3/$: w stężeniu 5 mM powodował zahamowanie reakcji /Ryc. 5c/;

c/ fluorek sodu $/\text{NaF}/$: w stężeniu 5 mM wywoływał nieznaczne osłabienie reakcji /Ryc. 5d/;

d/ 3-amino,1,2,4-triazol: w stężeniach 0,01 - 0,1 M nie wywierał żadnego uchwytne go wpływu na intensywność reakcji /Ryc. 5e/;

e/ indometacyna: w stężeniach 1 μM - 1 mM pozostawała bez wpływu na reakcję /Ryc. 5f/.

7. Wpływ osmolarności płynu inkubacyjnego.

a/ obecność w płynie inkubacyjnym sacharozy w stężeniach

0 - 10% pozostaje bez wpływu na wynik reakcji /Ryc. 6a/.

Stężenia sacharozy w granicach 10 - 30% stopniowo osłabiają intensywność reakcji, nie doprowadzając jednakże do jej całkowitego wygaszenia;

b/ obecność w płynie inkubacyjnym NaCl w stężeniu 0,9%,

bądź też zastąpienie buforu roztworem soli fizjologicznej lub płynem Ringera o pH 8,0 /uzyskanym przez dodanie 0,01 M NaOH/ zapobiega wystąpieniu reakcji /Ryc. 6b/;

c/ obecność w płynie inkubacyjnym 7,5% poliwinylpyrolidonu /PVP/ zapobiega wystąpieniu reakcji /Ryc.6c/.

Przy progowych stężeniach 0,5% NaCl oraz 3% PVP obserwuje się osłabienie reakcji. Efekt całkowitego zahamowania reakcji uzyskać można również przy równoczesnej obecności 7,5% sacharozy oraz 0,9% NaCl lub 7,5% PVP.

Przeprowadzono szereg eksperymentów zmierzających do ustalenia wpływu izosmotycznych stężeń trzech wymienionych stabilizatorów mitochondrialnych na reakcje tkanek z DAB w różnych warunkach inkubacji /Ryc. 6d, 7/. Wyniki przedstawione zostały zbiorczo w Tablicy I. /p. str. 17/

8. Reakcje kontrolne.

- a/ reakcja wykrywająca aktywność oksydazy cytochromowej wg Seligmana i wsp. /99/ oraz reakcja lokalizująca cytochromy wg Novikoffa i Goldfischera /76/ wykazały analogiczne rozmieszczenie elementów reagujących pozytywnie w badanych narządach. Ponadto w obecności egzogennej cytochromu c oraz przy zastosowaniu metody Novikoffa obserwowano pojawienie się produktu reakcji w szeregu innych struktur tkankowych /wątroba, siatkówka, tarczyca, mózg i in./;
- b/ reakcje wykrywające aktywność endogennych peroksydaz oraz lokalizujące peroksysony wykazały rozmieszczenie elementów reagujących pozytywnie zgodne z uprzednimi doniesieniami /74, 76/ natomiast odmienne od uzyskanego w badanej reakcji;
- c/ wyniki reakcji z utlenioną DAB, wykrywającej hemoproteidy w dużej mierze pokrywały się z wynikami uzyskanymi w przedstawionych badaniach. Dodatkowymi elementami reagującymi pozytywnie przy zastosowaniu tej metody były erytrocyty. Reakcja ta odznaczała się ponadto niewrażliwością na utrwalaanie w aldehydzie glutarowym /3 - 24 h/ /Ryc. 7/.

Tablica I

Wpływ izoosmotycznych stężeń NaCl, sacharozy i PVP
na mitochondrialne reakcje z DAB

Utrwalanie, skład płynu inkubacyjnego, czas inkubacji	brak protekcji	0,9% NaCl	7,5% sacharozy	7,5% PVP
Tkanka nieutrwalona; buf. Tris/HCl, pH 7,4 + DAB; 30 min	+++	-	+++	-
Tkanka nieutrwalona; buf. Tris/HCl, pH 7,4 + DAB; 3 h	++++	+	++++	-
Tkanka nieutrwalona; szok osmotyczny /5 min w H ₂ O/; buf. Tris/HCl, pH 7,4 + DAB; 30 min	+++	-	+++	-
Tkanka nieutrwalona; buf. Tris/HCl, pH 7,4 + DAB + cytochrom c /1 mg/ml/ + katalaza /2 ug/ml/; 30 min	++++	++++	++++	++
Utr. 4% paraformaldehyd; buf. Tris/HCl, pH 7,4, + DAB + cytochrom c + katalaza; 1 h	++++	++++	++++	+
Tkanka nieutrwalona; buf. octanowy pH 6,0 + DAB + 0,5 mM MnCl ₂ + 0,001% H ₂ O ₂ /wg 76/; 30 min	++++	+++	++++	-
Utr. 2,5% ald. glutarowy; buf. Tris/HCl, pH 7,2 + utleniona DAB /wg 40/; 24 h	+++	+++	+++	+

Objaśnienie symboli: -: brak reakcji; +: reakcja dodatnia na
granicy uchwytności; +++ reakcja słaba; ++++: reakcja o śred-
niej intensywności; ++++: reakcja intensywna

II. Reakcja zależna od obecności wielonienasyconego kwasu tłuszczowego w płynie inkubacyjnym.

Przy zastosowaniu progowego stężenia KCN hamującego reakcję nieswoistą /5 mM/ uzyskano pozytywną reakcję w skrawkach inkubowanych w płynie zawierającym 300 μ M kwasu arachidonowego, przy równoczesnym braku reakcji w skrawkach kontrolnych inkubowanych bez substratu. Reakcja ta swą lokalizacją odpowiadała reakcji uzyskanej przez Janszena i Nugterena /42/.

1. Lokalizacja aktywności.

Spośród wszystkich przebadanych tkanek i narządów pozytywną reakcję obserwowano jedynie w komórkach cewek zbiorczych i komórkach śródmiąższowych nerki królika oraz w nabłonku wydzielniczym pęcherzyków nasiennych tryka.

W nerce produkt reakcji pojawiał się w komórkach cewek zbiorczych przebiegających na terenie promienistości rdzennych w pobliżu granicy kory i rdzenia, intensywność reakcji w cewkach zbiorczych początkowo wzrastała, aby osiągnąć maksimum w obszarze na granicy rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego /Ryc. 8a/, a następnie zmniejszała się w miarę jak cewki zbiorcze zbliżały się do brodawki nerkowej. Reakcja nie uwidoczniła dwóch typów komórek ściany cewek zbiorczych opisywanych w badaniach ultrastrukturalnych /Ryc. 8 b,c/. W okolicy brodawki pozytywnie reagowały również komórki śródmiąższowe /Ryc. 8d/.

W komórkach gruczołowych pęcherzyków nasiennych /Ryc. 9a/ zwracała uwagę wyraźnie dodatnia reakcja błony jądrowej, z reguły silniejsza od reakcji cytoplazmatycznej /Ryc. 9b/.

2. Wpływ wysokiej temperatury na reakcję.

Zagotowanie skrawka przez okres 5 min całkowicie zapobiegało wystąpieniu reakcji. Ogrzewanie suchego skrawka w powietrzu, w temperaturze 100°C przez okres 15 min powodowało osłabienie reakcji do granicy uchwytności optycznej. Ogrzewanie suchego skrawka w temperaturze 80°C przez okres 10 min nie wywoływało znacznieszego osłabienia intensywności reakcji.

3. Dynamika reakcji.

Pierwszy ślad zabarwienia pojawiał się po upływie 15 min inkubacji i osiągał najwyższe natężenie po 2 h 30 min - 3 h inkubacji. Dalsze przedłużanie czasu inkubacji /przy zmianie płynu inkubacyjnego co godzinę, bądź też bez zmiany płynu inkubacyjnego/ nie wywoływało zwiększenia nasilenia reakcji.

4. Wpływ pH płynu inkubacyjnego.

Przebadano płyny inkubacyjne o pH od 0,75 do 10,2. Reakcja zachodziła w przedziale pH 5,5 - 8,5 uzyskując najwyższą intensywność w pH 7,5 - 8,0.

5. Wpływ stężenia DAB-HCl w płynie inkubacyjnym.

Stężenie minimalne wystarczające do wystąpienia optycznie uchwytnej reakcji wynosiło 0,1 mg DAB-HCl/ml, stężenie optymalne: 0,5 mg DAB-HCl/ml. Zwiększanie stężenia DAB-HCl powyżej 1 mg/ml nie wywoływało nasilenia intensywności reakcji.

6. Wpływ stężenia kwasu arachidonowego w płynie inkubacyjnym.

Ślad reakcji występuje przy progowym stężeniu kwasu arachidonowego - 30 μM , intensywność reakcji sukcesywnie wzrasta aż do najwyższego przebadanego stężenia 3 mM kwasu arachidonowego.

7. Wpływ utrwalania.

a/ utrwalenie fragmentów tkanki przed jej skrojeniem:

- 4% zdepolimeryzowany paraformaldehyd oraz formol-Ca powodują znaczne osłabienie reakcji;
- 2,5% aldehyd glutarowy całkowicie zapobiega wystąpieniu reakcji;

b/ utrwalenie skrawków kriostatowych przed inkubacją:

- wszystkie badane utrwalacze powodowały całkowite wygaszenie reakcji, jeżeli czas utrwalania skrawka przekraczał 5 min. Utrwalanie w 4% zdepolimeryzowanym paraformaldehynie lub w formol-Ca przez 1 min powodowało wyraźne osłabienie intensywności reakcji. Pozostałe utrwalacze nawet po tak krótkim czasokresie działania hamowały reakcję zupełnie.

8. Wpływ dwumetylosulfotlenku /DMSO/ na reakcję.

Dodanie DMSO do płynu inkubacyjnego powoduje nieznaczne, choć uchwytnie zwiększenie intensywności reakcji /Ryc. 10/. Efekt ten osiąga maksimum przy stężeniu 2% DMSO.

9. Wpływ protekcji osmotycznej na reakcję.

Obecność w płynie inkubacyjnym 0,9% NaCl lub 7,5% sacharozy nie wpływa na intensywność reakcji. Przy dodaniu do płynu inkubacyjnego 7,5% PVP obserwowano całkowite wygaszenie reakcji /Ryc. 11/.

10. Wpływ inhibitorów.

Bez wpływu na reakcję pozostawały:

- a/ KCN /1 - 10 mM/, /Ryc. 12b/;
- b/ NaF /5 - 10 mM/, /Ryc. 12c/;
- c/ NaN_3 /5 - 10 mM/, /Ryc. 12d/;
- d/ indometacyna /1 μM - 1 mM/, /Ryc. 12e/;

e/ kwas mefenamowy /Ponstan//2 - 10 mM/, /Ryc. 12f/;

f/ kwas acetylosalicylowy /5 - 25 mM/, /Ryc. 12g/.

Substancje te nie hamowały reakcji ani w wypadku dodania ich do płynu inkubacyjnego, ani w wypadku uprzedniej preinkubacji skrawków w ich obecności. Ta ostatnia metoda mogła być stosowana tylko w bardzo ograniczonym zakresie, ponieważ preinkubacja skrawków w samym buforze w temperaturze 18°C przez okres 15 min wywoływała wyraźne osłabienie reakcji, a powyżej 30 min jej zupełne wygaszenie;

g/ 3-amino,1,2,4-triazol w stężeniach powyżej 10 mM całkowicie hamował reakcję /Ryc. 12 h/.

11. "Fałszywe" substraty.

Wprowadzenie do płynu inkubacyjnego nasyconych kwasów tłuszczowych /palmitynowego i stearynowego, 3 mM/ w miejsce kwasu arachidonowego nie dało w efekcie reakcji pozytywnej /Ryc. 13a/. Taki sam rezultat uzyskano zastępując kwas arachidonowy kwasem olejowym /3 mM/, /Ryc. 13b/.

Po zastąpieniu kwasu arachidonowego kwasem linolowym lub linolenowym /3 mM/, /Ryc. 13 c,d/ obserwowano wystąpienie reakcji dodatniej o takiej samej lokalizacji narządowej i tkankowej jak reakcja zależna od kwasu arachidonowego. Przy zastosowaniu jednakowych stężeń trzech wymienionych powyżej nienasyconych kwasów tłuszczowych intensywność reakcji była najniższa w przypadku kwasu linolowego, najwyższa zaś w przypadku kwasu arachidonowego.

Dodatnią reakcję o identycznej lokalizacji i znacznie większej intensywności uzyskano po dodaniu do płynu inkubacyjnego w miejsce kwasu arachidonowego 0,003% H_2O_2 /Ryc. 13 f,g,h/.

Wszystkie wymienione powyżej reakcje cechowały się takimi samymi własnościami histochemicznymi /wpływ pH, wrażliwość na utrwalanie i inhibitory/ jak reakcja zależna od kwasu arachidonowego.

12. Wpływ katalazy.

Dodanie do płynu inkubacyjnego 300 µg/ml krystalicznej katalazy /z wątroby wolej/ zapobiegało wystąpieniu reakcji wykorzystującej H_2O_2 jako substrat, natomiast pozostawało bez wpływu na reakcje zależne od obecności w/w nienasyconych kwasów tłuszczowych w środowisku inkubacyjnym /Ryc. 14/.

13. Wpływ kofaktorów syntezy prostaglandyn.

Zredukowany glutation w ilości 10 mM dodany do płynu inkubacyjnego nie wywierał żadnego uchwytanego wpływu na reakcję, /Ryc. 15a/. Hydrochinon w stężeniu 10 mM powodował zahamowanie reakcji /Ryc. 15b/.

B. Mikroskop elektronowy

I. Reakcja nieswoista, występująca w nieobecności kwasu arachidonowego.

W komórkach, w których mikroskop optyczny wykazał obecność produktu reakcji z DAB /komórki kanalików nerkowych, m. sercowego, komórki okładzinowe/ mikroskop elektronowy ujawnił gęsty elektronowo strąć DAB związanej z osmem zlokalizowany wyłącznie w mitochondriach /Ryc. 16/. Produkt reakcji wypełniał przestrzeń pomiędzy błoną zewnętrzną i wewnętrzną mitochondriów, oraz wewnątrz grzebieni mitochondrialnych.

Inne struktury, a w szczególności peroksysomy oraz siateczka śródplazmatyczna nie wykazywały obecności DAB. Na po-

ziomie ultrastrukturalnym zostały potwierdzone również zmiany reaktywności mitochondriów zależne od inhibitorów oraz stabilizatorów mitochondrialnych /NaCl, sacharozy, PVP/ opisane poprzednio na podstawie obrazu uzyskanego ze skrawków kriostatowych w mikroskopie optycznym.

II. Reakcja zależna od obecności wielonienasyconego kwasu tłuszczowego w płynie inkubacyjnym.

Ultrastrukturalna lokalizacja reakcji histochemicznej zależnej od kwasu arachidonowego wiązała się z licznymi trudnościami metodycznymi. Utrwalanie tkanki en bloc w 4% zdepolimeryzowanym paraformaldehydzie - jedyny sposób utrwalania pozwalający na zachowanie aktywności enzymatycznej - znacznie osłabiało reakcję, tak, iż aczkolwiek była ona widoczna w mikroskopie optycznym, to jednak ilość strątu w przypadku ultracienkich skrawków do celów mikroskopu elektronowego była zbyt nikła, aby wytworzyć uchwytyny kontrast. Stąd też zachodziła konieczność inkubowania tkanek nieutrwalanych, co umożliwiało uwidocznienie produktu reakcji w ME, jednakże pociągało za sobą znaczne uszkodzenie wewnątrzkomórkowych struktur cytoplazmatycznych.

Inkubacja w płynie zawierającym DAB, KCN i kwas arachidonowy spowodowała pojawienie się elektronowo gęstego strątu DAB/osm w komórkach nabłonka gruczołowego pęcherzyków nasien-nych tryka, a także w komórkach cewek zbiorczych oraz w komórkach śródmiąższowych rdzenia nerki królika. Produkt reakcji, ilościowo dość skąpy, zlokalizowany był na błonach siateczki śródplazmatycznej i osłonki jądrowej /Ryc. 17/. Mitochondria, jak również pozostałe struktury wewnątrzkomórkowe nie wykazywały obecności strątu.

Identyczną lokalizację produktu reakcji obserwowano w przypadku zastąpienia kwasu arachidonowego kwasem linolowym lub linolenowym, a także H_2O_2 - w tym ostatnim przypadku ilość strątu była wyraźnie większa.

W materiale kontrolnym, inkubowanym bez substratu lub w obecności 10 mM aminotriazolu nie stwierdzono w komórkach rdzenia nerki i pęcherzyków nasiennych, ani gdziekolwiek indziej obecności strątu DAB.

DYSKUSJA

A. Reakcja nieswoista

Reakcja nieswoista pojawia się w korze nerki oraz w szeregu innych narządów w wypadku użycia płynu inkubacyjnego nie zawierającego kwasu arachidonowego, a zatem złożonego jedynie z buforu, DAB i KCN we wskazanym przez Janszena i Nugterena stężeniu 1 mM /42/. Utlenianie DAB przebiega tu na drodze enzymatycznej, za czym przemawiają: /a/ wrażliwość reakcji na gotowanie, /b/ hamowanie reakcji przy użyciu inhibitorów - KCN w stężeniu 5 mM i NaF również w stężeniu 5 mM. Wyższe niż w pracy Janszena i Nugterena stężenie KCN potrzebne do zahamowania reakcji nieswoistej wynika zapewne z różnic w technicznej stronie przygotowania inkubacji - w pracy niniejszej płyn inkubacyjny nakrapiany był na szkiełka w komorze wilgotnej; takie warunki stwarzają możliwość wyparowania pewnej części inhibitora z płynu inkubacyjnego, z czym należy się zawsze liczyć przy opisanym powyżej sposobie inkubacji, zwłaszcza gdy czas inkubacji jest długi.

Wrażliwość reakcji na KCN i NaF oraz jej lokalizacja ultrastrukturalna w obrębie przestrzeni międzybłonistych i wewnątrzgrzebieniowych mitochondriów są zbieżne z rezultatami uzyskiwanymi w reakcji wykrywającej przy użyciu DAB system oksydaza cytochromowa/cytochrom c /9, 19, 88, 99/. W oryginalnej metodzie Seligmana i wsp. /99/ płyn inkubacyjny zawiera ponadto egzogeny cytochrom c i katalazę, jednakże opisywano również pozytywne wyniki reakcji przy użyciu płynu inkubacyjnego bez tych dwóch składników /9, 99/ - do utlenienia DAB wystarcza wówczas endogeny cytochrom c obecny w tkance.

Różnice w reaktywności poszczególnych tkanek i narządów

obserwowane w niniejszych badaniach /np. silna reaktywność kory nerki i m. sercowego a słaba wątroby, czy mięśni szkieletowych/ możnaby zatem odnieść do różnic w ilościach endogennego cytochromu c w tych narządach. Różnice takie opisywano nawet w obrębie jednego narządu, wątroby /89/.

Odrębnego komentarza wymaga wpływ stabilizatorów mitochondrialnych na reakcje z DAB. W przypadku materiału nieutrwalonego, inkubowanego bez egzogenego cytochromu c, izoosmotyczne stężenia NaCl /0,9%/ i PVP /7,5%/ w płynie inkubacyjnym powodują całkowite zahamowanie reakcji. Możliwy na tej podstawie sądzić, że w warunkach tych wystąpienie pozytywnej reakcji z DAB w obrębie mitochondriów uzależnione jest od osmotycznego uszkodzenia tych organeli, a ich protekcja osmotyczna i stabilizacja zapobiega wystąpieniu reakcji. W tym ujęciu sacharoza, której obecność w stężeniu 7,5% nie hamuje utleniania DAB, byłaby traktowana jako nieodpowiedni stabilizator. Stanowisko takie znajduje potwierdzenie w badaniach Novikoffa nad izolowanymi mitochondriami /73/, w których wykazał on lepsze zachowanie struktury tych organeli w roztworze złożonym z sacharozy i PVP, niż w samej sacharozie. Zmiany reaktywności mitochondriów w wyniku ich pęcznienia w warunkach nie-izoosmotycznych, zwłaszcza w zakresie pH powyżej 6, są brane pod uwagę przy wykrywaniu aktywności dehydrogenaz /98/, tutaj też z reguły stosuje się 7,5% PVP, zazwyczaj wraz z jonami Mg^{++} , w celu stabilizacji i protekcji mitochondriów, oraz w celu zapobieżenia artefaktom dyfuzyjnym /17/. PVP stabilizuje aktywność enzymatyczną /20/; jedynie w przypadku pepsyny /22/ i - częściowo - dehydrogenazy mleczanowej /16/ opisano hamowanie aktywności enzyma-

tycznej pod wpływem PVP.

Przeciw przedstawionej powyżej hipotezie można wysunąć jednakże silne argumenty:

- 1/ szok osmotyczny, który uszkadza strukturę mitochondriów w tak znacznym stopniu, że następowa protekcja osmotyczna staje się bezcelowa, nie zmienia reaktywności nieutrwalonych mitochondriów z DAB w obecności NaCl i PVP;
- 2/ dodanie do płynu inkubacyjnego egzogenego cytochromu c powoduje wystąpienie silnej reakcji w obecności 0,9% NaCl /Ryc. 6d/ i pozytywnej, choć znacznie mniej intensywnej reakcji w płynie zawierającym 7,5% PVP;
- 3/ NaCl i PVP nie zapobiegają wystąpieniu reakcji z DAB w tkance utrwalonej, gdzie niebezpieczeństwo osmotycznego uszkodzenia mitochondriów jest znacznie mniejsze.

Egzogeny cytochrom c, jak wiadomo, zwiększa efekt aktywności oksydazy cytochromowej, przyspieszając proces utleniania DAB /99/. Można więc przyjąć, że wpływ NaCl i PVP polega na zmniejszeniu szybkości reakcji mitochondrialnych z DAB, a mechanizm działania obu tych substancji jest prawdopodobnie różny. NaCl wypłukuje endogeny cytochrom c z nieutrwalonych mitochondriów, szczególnie w przypadku powtarzanego mrożenia i rozmrażania /91/. Sam proces przygotowania skrawka kriostatowego wymaga co najmniej dwukrotnego zamrożenia i rozmrożenia tkanki /84/, można zatem przypuszczać, że w obecności NaCl w płynie inkubacyjnym następuje wypłukanie znacznej części endogenego cytochromu c z mitochondriów, a przy braku egzogenego cytochromu c reakcja zachodzi tak wolno, iż nie powoduje wytworzenia optycznie uchwytnej strątu DAB.

PVP, z drugiej strony, znacznie zwiększa gęstość i lepkość

płynu inkubacyjnego /16, 17/, co może obniżyć szybkość zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych reakcji mitochondriów z DAB.

Z przytoczonych obserwacji wynika, iż stabilizacja mitochondriów oraz protekcja osmotyczna tkanki przy użyciu PVP jest niewskazana w przypadku reakcji wykorzystujących utlenianie DAB. Wniosek ten potwierdza również hamowanie przez 7,5% PVP utleniania DAB zależnego od kwasu arachidonowego, a więc reakcji przebiegającej poza obrębem mitochondriów.

Dodatkowym argumentem przemawiającym za przypuszczeniem, że obserwowana reakcja nieswoista wywołana zostaje aktywnością oksydazy cytochromowej jest dodatnia reakcja w obecności NaCl nieutrwalonych mitochondriów inkubowanych w płynie wykrywającym - prawdopodobnie na drodze nieenzymatycznej - cytochrom b_5 /76/.

Pozytywną reakcję z DAB wykazywaną przez ziarnistości granulocytów obecnych w tkankach, występującą niezależnie od rodzaju i czasokresu utrwalania należy zapewne tłumaczyć odpornością peroksydazy zawartej w ziarnistościach granulocytów kwasochłonnych na utrwalanie /41/.

B. Reakcja warunkowana obecnością wielonienasyconego kwasu tłuszczowego w płynie inkubacyjnym

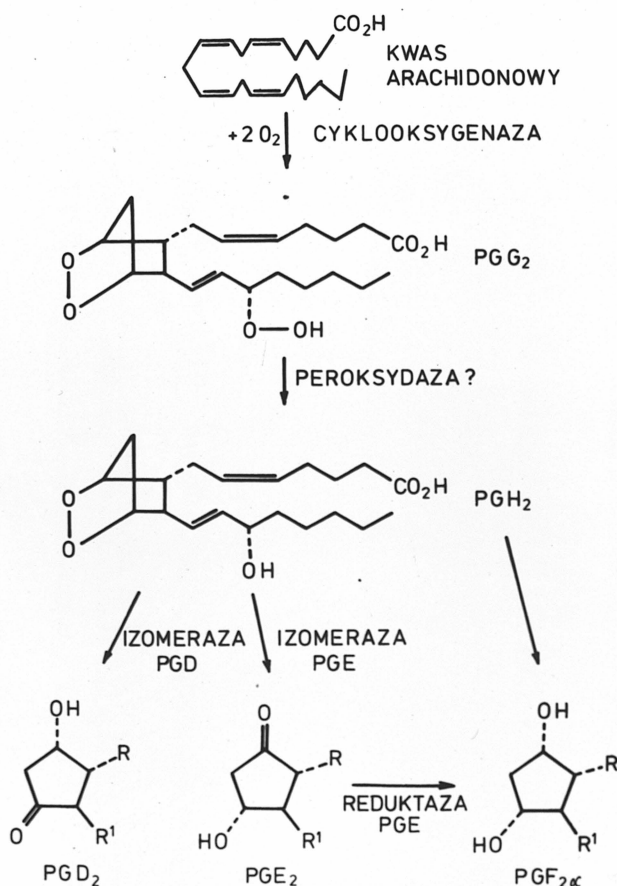
Reakcja opisywana w niniejszej pracy jako "specyficzna" pojawiała się w tkankach w obecności kwasu arachidonowego w płynie inkubacyjnym. Z założeń metody Janszena i Nugteren'a wynika, iż DAB utleniana jest przez produkty pośrednie biosyntezy prostaglandyn o charakterze aktywnych nadtlenków kwasów tłuszczowych /42/. Rozpatrując z teoretycznego punktu

widzenia możliwości utleniania DAB przez nadttlenki kwasów tłuszczowych w procesach wewnątrzkomórkowych przemian tych kwasów należałoby wziąć pod uwagę co najmniej trzy zasadnicze procesy, w których dochodzi do tworzenia nadttlenków:

- a/ biosyntezę prostaglandyn,
- b/ działanie niedawno wyodrębnionej grupy lipoksydaz /lipoksygenaz/ zwierzęcych /30, 32, 33, 78/,
- c/ nieenzymatyczną peroksydację lipidów.

I. Biosynteza prostaglandyn.

Tablica II obrazuje schematycznie zasadnicze etapy biosyntezy prostaglandyn /wg. Chana i wsp. /12/, zmodyfikowane/.



Nadtlenki odpowiedzialne - wg Janszena i Nugterena - za utlenienie DAB powstają w pierwszym etapie biosyntezy, w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym określany aktualnie jako cyklooksygenaza /31, 49, 58, 111/ - zatem metoda histochemiczna miałaby pośrednio wykrywać właśnie aktywność cyklooksygenazy.

Wyniki uzyskane w przedstawionych w niniejszej pracy badaniach histochemicznych nie potwierdzają powyższej hipotezy. Wprawdzie system enzymatyczny utleniający DAB w modelu histochemicznym wykazuje pewne cechy wspólne z cyklooksygenazą, jednakże posiada również szereg cech odmiennych.

1. Cechy wspólne z cyklooksygenazą.

a. Lokalizacja narządowa. Z szeregu przebadanych narządów pozytywną reakcję wykazały jedynie te, które równocześnie znane są z najwyższej aktywności cyklooksygenazy: pęcherzyki nasienne tryka, część rdzenna nerki królika /13, 15, 29, 52/ - jest to zbieżność uderzająca. W przypadku pęcherzyków nasiennych buhaja, cechujących się również wysoką aktywnością syntetazy prostaglandyn, negatywny wynik reakcji może być spowodowany obecnością ciepłochwijnego inhibitora, wykrytego w homogenatach, we frakcji nadsączu /105/. Pewne różnice występują również w komórkowej lokalizacji aktywności syntetazy prostaglandyn i badanego systemu enzymatycznego na terenie nerek: produkt reakcji histochemicznej lokalizował się głównie w komórkach nabłonkowych cewek zbiorczych, a jedynie w nieznacznym stopniu w komórkach śródmiażdżowych, głównie w okolicach brodawki. Tymczasem badania biochemiczne wykazały aktywność

syntetazy prostaglandyn przede wszystkim w komórkach śródmiąższowych /53, 62, 63, 87/, jakkolwiek brak jest badań w tym zakresie nad wyizolowanymi komórkami ściany kanalików zbiorczych.

Obecność produktu reakcji histochemicznej w nielicznych cewkach zbiorczych na terenie promienistości rdzennych strefy korowej wydaje się również stać w sprzeczności z wynikami badań biochemicznych, lokalizujących syntetazę prostaglandyn wyłącznie na terenie rdzenia nerki /15/.

Wyniki te zostały jednak ostatnio zrewidowane, ponieważ udało się wykazać dość znaczną aktywność syntetazy prostaglandyn również w korze nerki /52/, aktywność ta jest jednakże maskowana przez dehydrogenazę prostaglandyn, której obecność właśnie w części korowej nerki została potwierdzona zarówno biochemicznie /3/ jak i histochemicznie /70/.

b. Lokalizacja ultrastrukturalna. Na poziomie mikroskopu elektronowego produkt reakcji można znaleźć w obrębie błon siateczki śródplazmatycznej oraz osłonki jądrowej. Badania frakcji komórkowych pozwoliły na powiązanie aktywności syntetazy prostaglandyn wyłącznie z frakcją mikrosomalną, odpowiadającej głównie błonom siateczki śródplazmatycznej /2, 6, 7, 83, 105, 111/. Nie przeprowadzono pomiaru aktywności syntetazy prostaglandyn we frakcji jądrowej, która z reguły była wyłączana z eksperymentów.

c. Wpływ pH. Uzyskane w doświadczeniach histochemicznych optymalne pH dla badanego systemu enzymatycznego /7,5 - 8,0/ jest zgodne z wynikami biochemicznych oznaczeń optymalnego zakresu pH dla syntezy prostaglandyn, a w szczególności

dla cyklooksygenazy /90, 93, 109/.

- d. Ciepłostabilność. Zaskakująco znaczna stabilność badanego systemu enzymatycznego w wysokich temperaturach przy małej wilgotności otoczenia znajduje swe odbicie w ciepłostabilności syntetazy prostaglandyn, którą wykazano w badaniach biochemicznych /109/.
 - e. Brak wrażliwości na KCN. Stężenia KCN do 10 mM nie hamowały aktywności badanego histochemicznie systemu enzymatycznego. Cyklooksygenaza jest również niewrażliwa na KCN /105/, jakkolwiek cyjanki hamują inny enzym systemu syntetazy: reduktazę endonadtlenków /94/.
2. Cechy badanego systemu enzymatycznego sprzeczne z cechami cyklooksygenazy.
- a. Brak wrażliwości na indometacynę. Indometacyna w stężeniach do 1 mM nie hamowała badanego systemu enzymatycznego zarówno w wypadku inkubacji w obecności inhibitora, jak też preinkubacji z indometacyną i następowej inkubacji również w jej obecności. Wynik ten wydaje się jednoznacznie świadczyć przeciwko tożsamości badanego systemu enzymatycznego i cyklooksygenazy, gdyż indometacyna jest swoistym i niezawodnym inhibitorem syntezy prostaglandyn, hamującym aktywność cyklooksygenazy /58/ w wielokrotnie niższych stężeniach niż użyte w przedstawionych badaniach /23/. Brak efektu hamowania w przypadku jednoczesnej obecności indometacyny i kwasu arachidonowego możnaby ewentualnie tłumaczyć ochronnym działaniem substratu na centra aktywne enzymu, podobne rezultaty uzyskano w badaniach biochemicznych /102/, jednakże uprzednia preinkubacja z indometacyną

w modelu biochemicznym powodowała zawsze zahamowanie aktywności syntetazy prostaglandyn. Dodatkowymi argumentami przemawiającymi przeciwko identyfikacji badanego systemu enzymatycznego jako cyklooksygenazy jest jego niewrażliwość na dwa inne swoiste inhibitory syntezy prostaglandyn: kwas mefenamowy oraz kwas acetylosalicylowy /23, 108/.

- b. Czas inkubacji. Długi czas inkubacji, potrzebny do uzyskania dostatecznej ilości produktu reakcji histochemicznej koniecznego do jej uwidocznienia /90 - 180 min/ pozostaje w sprzeczności z typowym dla syntetazy prostaglandyn zjawiskiem autokatalitycznej destrukcji systemu enzymatycznego, obserwowanym w modelu biochemicznym już po upływie kilkunastu minut inkubacji /50, 103, 105/.
- c. Brak inhibicji substratowej. W doświadczeniach histochemicznych najwyraźniejszą lokalizację produktu reakcji uzyskano przy stężeniach kwasu arachidonowego rzędu 0,3 - 3,0 mM, co jest niezgodne ze zjawiskiem inhibicji syntetazy prostaglandyn przez stężenia substratu wyższe niż 0,3 mM, obserwowanym w badaniach biochemicznych /105, 109/.
- d. Wykorzystywanie "fałszywych" substratów. Badany system enzymatyczny wykorzystuje poza kwasem arachidonowym również inne wielonienasycone kwasy tłuszczowe: kwas linolowy i linolenowy, które nie są substratami dla syntezy prostaglandyn, i co więcej, hamują tę syntezę /81/.
- e. Wpływ kofaktorów. Bez wpływu na reakcję pozostawał zredukowany glutation, jeden z najistotniejszych kofaktorów biosyntezy prostaglandyn, in vivo zastępowany przez kate-

cholaminy lub 5-HT /80, 101/. Inny istotny w modelu biochemicznym kofaktor, hydrochinon /83/ powodował całkowite zahamowanie reakcji. Hydrochinon, jako donator elektronów najprawdopodobniej zastępuje kompetytywnie DAB i zamiast niej ulega utlenieniu w reakcji histochemicznej.

Przytoczone powyżej argumenty świadczą o tym, iż brak jest wystarczających podstaw do jednoznacznego wiązania badanego systemu enzymatycznego z syntetazą prostaglandyn, i że interpretacja wyników podana przez Janszena i Nugterena nie może być nadal podtrzymywana. Należy zatem rozpatrzyć również inne wymienione na wstępie dyskusji możliwości utlenienia DAB w procesach metabolicznych, w których biorą udział nadtlenki kwasów tłuszczowych.

II. Lipoksygenazy.

Lipoksygenazy są enzymami wykorzystującymi jako substrat wielonienasycone kwasy tłuszczowe, m.in. te same, które są materiałem wyjściowym do biosyntezy prostaglandyn i katalizującymi ich przemianę w nadtlenki - w odróżnieniu od produktów pośrednich biosyntezy prostaglandyn nie posiadające charakteru cyklicznego /30, 32, 33, 78/. Badania biochemiczne wykazały jednakże, że są to enzymy rozpuszczalne, nie związane z błonami /78/, zatem w modelu histochemicznym winny one dyfundować z nieutrwalonej tkanki do płynu inkubacyjnego, a ich lokalizacja byłaby możliwa jedynie po uprzednim utrwaleniu tkanki. Badany system enzymatyczny wykazuje dokładnie odwrotne właściwości: najlepszą lokalizację uzyskuje się w tkance nieutrwalonej, zaś utrwalanie w znacznym stopniu hamuje aktywność enzymatyczną.

III. Peroksydacja lipidów.

Peroksydacja lipidów, głównie zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe jest procesem, którego znaczenie w zjawiskach patologii komórkowej jest coraz szerzej doceniane /18, 106/. Tworzące się w tym przeważnie nieenzymatycznym procesie produkty pośrednie w postaci nadtlenków kwasów tłuszczowych obdarzonych cechami wolnych rodników mogą wywierać toksyczny wpływ na komórkę.

IV. Hipoteza endogennej peroksydazy.

Wrażliwość badanego systemu enzymatycznego na aminotriazol, swoisty inhibitor katalazy /57/ i szeregu peroksydaz /10, 21/ wskazuje na przynależność tego systemu właśnie do tej grupy enzymów. Z wyników przytoczonych eksperymentów wynika, że reakcja histochemiczna zachodząca pod wpływem nienasyconych kwasów tłuszczowych ma wiele cech reakcji lokalizującej endogenną peroksydazę. Przemawia za tym:

- a/ drażliwość na aminotriazol;
- b/ lokalizacja ultrastrukturalna: w błonach siateczki śródplazmatycznej i osłonki jądrowej - zgodna z lokalizacją wszystkich opisywanych endogennych peroksydaz /11, 74, 92/;
- c/ drażliwość na utrwalanie, zwłaszcza w aldehydzie glutarowym - wpływ utrwalania w glutaraldehydzie na aktywność enzymu jest zasadniczą cechą różnicującą w modelu histochemicznym endogenne peroksydazy, drażliwe na aldehyd glutarowy i katalazę, która pod wpływem tego aldehydu w znacznym stopniu zwiększa swą aktywność peroksydacyjną /36, 37, 92/;
- d/ optymalny zakres pH - zgodny z zakresem zalecanym dla wykrywania endogennych peroksydaz /74, 92/;

e/ identyczna lokalizacja narządowa i tkankowa przy zastąpieniu kwasu tłuszczowego nadtlutkiem wodoru, typowym akceptorem elektronów w reakcjach katalizowanych przez peroksydazy.

Badany system enzymatyczny różni się jednakże kilkoma właściwościami od dotychczas opisywanych endogennych peroksydaz: po pierwsze, nie jest wrażliwy na dwa inhibitory peroksydaz: NaF i KCN w stężeniach do 10 mM. Brak wrażliwości na 10 mM KCN został ostatnio opisany w przypadku histochemicznej lokalizacji laktoperoksydazy gruczołu młecznego /1/; po drugie, wykorzystuje w charakterze akceptora elektronów nie tylko H_2O_2 , ale również nadtlutki nienasyconych kwasów tłuszczowych. Znaną cechą peroksydaz jest znaczna swoistość substratowa w stosunku do H_2O_2 , jakkolwiek opisywano peroksydazy przenoszące elektrony na nadtlutki alkilowe, nadtlutki glikozydów nasercowych, czy nadtlutki powstałe w wyniku działania lipoksygenazy na kwas linolowy /97/.

Występowanie reakcji zależnej od kwasów tłuszczowych w obecności katalazy w płynie inkubacyjnym przemawia jednoznacznie za tym, iż akceptorem elektronów w tym przypadku nie jest nadtlutek wodoru pojawiający się w tkance na skutek dodania kwasów tłuszczowych, lecz najprawdopodobniej nadtlutki tych kwasów. Nadtlutki te pochodzą z różnych źródeł: przede wszystkim kwasy tłuszczowe w roztworze wodnym bardzo szybko ulegają autooksydacji, a zatem pewna ilość nadtlutków może być wprowadzana do płynu inkubacyjnego już w momencie dodania kwasu tłuszczowego. Wprowadzony egzogeny kwas tłuszczowy może również ulegać peroksydacji w samej tkance: zarówno w procesie nieenzymatycznym, jak i katalizowanym przez lipo-

ksygenazę oraz/lub cyklooksygenazę. Metodami histochemicznymi nie można jednak w chwili obecnej rozdzielić tych źródeł i ustalić stopnia partycypacji poszczególnych procesów w reakcji histochemicznej, będącej ich sumarycznym wynikiem.

Wzmocnienie intensywności reakcji histochemicznej pod wpływem DMSO można najprawdopodobniej tłumaczyć znanym efektem labilizacji błon biologicznych w wyniku działania DMSO /24, 54, 55/, i co za tym idzie łatwiejszym dostępem substratu do wnętrza komórek. Z drugiej strony jednak pojawiły się doniesienia o znacznym nasileniu biosyntezy prostaglandyn E pod wpływem DMSO /48/.

V. Aktywność peroksydazy a biosynteza prostaglandyn.

Analizowana w niniejszej pracy metoda histochemiczna nie wykrywa zatem, jak to wynika z przedstawionych powyżej rozważań, syntetazy prostaglandyn, lecz najprawdopodobniej peroksydazę, dla której część substratów może pochodzić z procesu biosyntezy tych związków - aczkolwiek brak wpływu indometacyny na reakcję histochemiczną wskazuje, iż ilość nadtlenków prostaglandyn w stosunku do całej puli substratów jest bardzo znikoma.

Nasuwa się w tym miejscu pytanie: czy i w jaki sposób peroksydaza ta związana jest z biosyntezą prostaglandyn? Za tym, że taki związek może istnieć przemawia uderzająca zbieżność lokalizacji narządowej opisywanej peroksydazy: jej umiejscowienie pokrywa się ściśle z najbardziej intensywną biosyntezą prostaglandyn /pęcherzyki nasienne, rdzeń nerki/; co więcej, nienasycone kwasy tłuszczowe nie wywołują utlenienia DAB w narządach nie odznaczających się szczególnie nasiloną bio-

syntezą prostaglandyn, posiadających natomiast wysoce aktywną endogenną peroksydazę /tarczyca, ślinianki/ /74, 92/. Wydaje się zatem, że opisywany w niniejszej pracy enzym odznacza się cechami szczególnymi, odmiennymi od typowych peroksydaz endogennych - do cech tych należy w pierwszym rzędzie zaliczyć zdolność wykorzystywania nadtlenu kwasów tłuszczowych w charakterze akceptora elektronów. Innym argumentem, który zdaje się świadczyć za istnieniem powiązania między aktywnością opisywanej peroksydazy i biosyntezą prostaglandyn jest silne hamowanie tej biosyntezy przez 3-amino,1,2,4-triazol - swoisty inhibitor peroksydaz, stwierdzone w badaniach biochemicznych /82/. Autorzy cytowanej tu pracy sugerowali udział peroksydazy i endogenego H_2O_2 w pierwszym etapie biosyntezy: w oksygenacji prekursorowego kwasu tłuszczowego, który byłby utleniany przez tlen atomowy pochodzący z rozkładu H_2O_2 . Hipoteza ta znajduje się jednak w zasadniczej sprzeczności z wynikami klasycznych już badań Samuelssona /95/ dowodzącymi w sposób bezdyskusyjny, że dwa atomy tlenu wytwarzające układ wewnętrznego nadtlenu przy C-11 pochodzą z jednej cząsteczki, najpewniej tlenu atmosferycznego.

Możnaby raczej przypuszczać, iż peroksydaza ta dzięki swym specyficznym własnościom bierze udział w drugim etapie biosyntezy: w przekształceniu endonadtlenu w cząsteczkę prostaglandyny. Działanie peroksydazy nie może dotyczyć ugrupowania nadtlenkowego przy C-9 - C-11, gdyż dalsze przekształcenia tego ugrupowania /izomeryzacja wewnętrzna bądź redukcja/ zachodzą przy udziale izomerazy i reduktazy, swoistych enzymów decydujących o kierunku biosyntezy - w stronę prostaglandyn E bądź prostaglandyn F /31, 49, 58, 111/. W przejściowo powstającym

nadtlenku /PGG/ istnieje jednak jeszcze jedno takie ugrupowanie przy C-15, ulegające redukcji w wyniku reakcji /PGG $\rightarrow$ PGH, p. Tablica II/, której mechanizm jest do chwili obecnej niejasny: sugeruje się możliwość procesu nieenzymatycznego /150/, nie można jednak wykluczyć, iż tu właśnie może znajdować się punkt uchwytu enzymu o charakterze peroksydazy przekazującej elektrony na ugrupowania nadtlenkowe kwasów tłuszczowych. Taka hipoteza również tłumaczyłaby hamujące działanie aminotriazolu na biosyntezę prostaglandyn. Nugteren i Hazelhof /79/ proponowali udział peroksydazy glutationu w procesie redukcji nadtlenku przy C-15 /PGG $\rightarrow$ PGH/. W modelu histochemicznym zredukowany glutation nie wpływa na utlenienie DAB, zatem, jak się wydaje, nie stanowi konkurencyjnego dla DAB donatora elektronów. Dla pełnego wyjaśnienia ewentualnego udziału enzymu o charakterze peroksydazy w biosyntezie prostaglandyn konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, głównie biochemicznych.

W świetle uzyskanych wyników podkreślenia godne wydaje się przypuszczenie, iż w przeciwieństwie do pierwszego etapu biosyntezy prostaglandyn, katalizowanego w sposób ściśle swoisty przez cyklooksygenazę, następowe przemiany produktów pośrednich o charakterze nadtlenków mogą zachodzić przy udziale nieswoistych dla biosyntezy prostaglandyn enzymów typu peroksydazy.

WNIOSKI

I. Wnioski merytoryczne.

1. Histochemiczna metoda Janszena i Nugterena /42/ nie wykrywa swoiście syntetazy prostaglandyn.
2. Inkubacja tkanek w płynie zawierającym DAB, KCN oraz wielonienasycony kwas tłuszczowy ujawnia aktywność systemu enzymatycznego o cechach peroksydazy wykorzystującej w charakterze akceptora elektronów nadtlenu kwasów tłuszczowych.
3. Sugeruje się, iż opisywana peroksydaza może brać udział w biosyntezie prostaglandyn, redukując ugrupowanie nadtlennkowe przy C-15 endonadtlenku /PGG/ powstałego w wyniku działania cyklooksygenazy.

II. Wnioski metodyczne.

1. Optymalny skład płynu inkubacyjnego dla reakcji demonstrującej w/w peroksydazę: DAB: 0,5 mg/ml; KCN: 5 mM; wielonienasycony kwas tłuszczowy: 3 mM - 4 mM; bufor 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; ew. DMSO: 2%.
2. Zbyt niskie stężenie KCN w płynie inkubacyjnym prowadzi do utlenienia DAB przez system oksydaza cytochromowa/cytochrom c, co maskuje reakcję zależną od peroksydazy.
3. W metodach inkubacji, w których płyn inkubacyjny nakrapiany jest na szkiełka w komorze wilgotnej należy stosować wyższe stężenia lotnych substratów i inhibitorów /np. KCN/ od stężeń używanych w modelach biochemicznych, ponieważ pewna część substratu lub inhibitora wyparowuje z płynu inkubacyjnego, zwłaszcza przy dłuższych czasokresach inkubacji.

4. W metodach histochemicznych wykorzystujących utlenianie DAB nie należy stosować poliwinylpyrolidonu /PVP/ do ochrony osmotycznej tkanek i stabilizacji mitochondrów, gdyż spowodowane przez PVP zwiększenie gęstości i lepkości środowiska prowadzi do znacznego zwolnienia reakcji i w efekcie do wytworzenia zbyt małych ilości strątu spolimeryzowanej DAB.

STRESZCZENIE

W pracy poddano krytycznej analizie metodę lokalizacji syntetazy prostaglandyn opisaną przez Janszena i Nugterena /Histochemie 27, 159, 1971/. Badania przeprowadzono na szerokim wachlarzu tkanek zwierzęcych, analizując takie własności w/w reakcji histochemicznej, jak: ciepłostabilność, wpływ pH, wpływ stężeń substratów, wpływ utrwalania, wpływ protekcji osmotycznej, działanie "fałszywych" substratów i inhibitorów, lokalizacja tkankowa i ultrastrukturalna.

Wykazano, iż stężenie KCN w płynie inkubacyjnym podane przez autorów metody jest zbyt niskie i nie zapobiega wystąpieniu nieswoistej reakcji zależnej od systemu oksydaza cytochromowa/cytochrom c, maskującej reakcję właściwą.

Na podstawie obserwowanych własności reakcji histochemicznej uzyskiwanej przy użyciu badanej metody wysnuło wniosek, iż reakcja ta, wbrew postulatam autorów, nie demonstruje aktywności syntetazy prostaglandyn, gdyż np. jest niewrażliwa na typowe inhibitory syntetazy /indometacyna/, a także wykorzystuje kwasy tłuszczowe nie przekształcane w prostaglandyny; natomiast szereg jej cech wskazuje na przynależność do reakcji wykrywających endogenne peroksydazy. System enzymatyczny odpowiedzialny w tym przypadku za wystąpienie reakcji różni się od typowych peroksydaz endogennych zdolnością do przekazywania elektronów na nadtlenki kwasów tłuszczowych, które służą tu jako substrat.

Sugeruje się, iż tego rodzaju peroksydaza może brać udział w biosyntezie prostaglandyn /na etapie przemiany $PGG \rightarrow PGH$ / związanej z redukcją ugrupowania nadtlenkowego przy C-15/.

W oparciu o wyniki eksperymentów histochemicznych sformułowano również wnioski natury metodycznej, dotyczące wpływu protekcji osmotycznej na reakcje histochemiczne z DAB, oraz nie-

zbędnych stężeń substratów i inhibitorów w określonych warunkach inkubacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson W.A., Trantalis J., Kang Y.-H.: Ultrastructural localization of endogenous mammary gland peroxidase during lactogenesis in the rat: results after tannic acid-formaldehyde-glutaraldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 23, 295-302 /1975/
2. Anggård E., Bohman S.O., Griffin J.E., Larsson C., Maunsbach A.B.: Subcellular localization of the prostaglandin system in the rabbit renal papilla. *Acta physiol. scand.* 84, 231-246 /1972/
3. Anggård E., Larsson C., Samuelsson B.: The distribution of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and prostaglandin -13 reductase in tissues of the swine. *Acta physiol. scand.* 81, 396-404 /1971/
4. Bartoszewicz W., Dandekar P., Glass R.H., Gordon M.: Localization of prostaglandin on the plasmalemma of rabbit sperm. *J. exp. Zool.* 191, 151-159 /1975/
5. Beard M.E., Novikoff A.B.: Distribution of peroxisomes /microbodies/ in the nephron of the rat. A cytochemical study. *J. Cell Biol.* 42, 501-518 /1969/
6. Bohman S.O.: Subcellular localization of prostaglandin synthesis in rabbit renal papilla. *J. Ultrastruct. Res.* 38, 191 /1972/
7. Bohman S.O., Larsson C.: Prostaglandin synthesis in membrane fractions from the rabbit renal medulla. *Acta physiol. scand.* 94, 244-258 /1975/
8. Bussolati G.: Histochemical demonstration of sulphate groups by means of diaminobenzidine. *Histochem. J.* 3, 445-449 /1971/
9. Cammer W., Moore C.L.: Oxidation of 3,3'-diaminobenzidine by rat liver mitochondria. *Biochemistry* 12, 2502-2506 /1973/
10. Castelfranco P.: Inhibition of some metalloprotein enzymes by 3-amino,1,2,4-triazole. *Biochim. biophys. Acta* 41, 485-491 /1960/

11. Cavallo T.: Fine structural localization of endogenous peroxidase activity in inner medullary interstitial cells of the rat kidney. *Lab. Invest.* 31, 458-464 /1974/
12. Chan J.A., Nagasawa M., Takeguchi C., Sih C.J.: On agents favoring prostaglandin F formation during biosynthesis. *Biochemistry* 14, 2987-2991 /1975/
13. Christ E.J., Van Dorp D.A.: Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Biochim. biophys. Acta* 270, 537-545 /1972/
14. Comai K., Prose P., Farber S.J.: Correlation of renal medullary prostaglandin content and renal interstitial cell lipid droplets. *Prostaglandins* 6, 375-379 /1974/
15. Crowshaw K., Szlyk J.Z.: Distribution of prostaglandins in rabbit kidney. *Biochem. J.* 116, 421-424 /1970/
16. Dahl H.A., From S.H.: Some effects of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone on the activity of lactate dehydrogenase and its isoenzymes. *Histochemie* 25, 182-190 /1970/
17. Dahl H.A., Mellgren S.I.: The effect of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone on diffusion artifacts in lactate dehydrogenase histochemistry. *Histochemie* 24, 354-370 /1970/
18. Demopoulos H.B.: Control of free radicals in biologic systems. *Fed. Proc.* 32, 1903-1908 /1973/
19. Duval J.-C.: Étude polarographique de l'activité mitochondriale en présence de diaminobenzidine. *C. R. Acad. Sci. /Paris/* 278, 257-260 /1974/
20. Eränkö O., Palkama A.: Improved localization of phosphorylase by the use of polyvinyl pyrrolidone and high substrate concentration. *J. Histochem. Cytochem.* 9, 585 /1961/
21. Evans W.H., Reichcigl M., Jr.: Factors influencing myeloperoxidase and catalase activities in polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. biophys. Acta* 148, 243-250 /1967/

22. Ferretti E.R., Valbuena O., Gimenes M.L., Gaede K.:
In vitro effects of polyvinyl pyrrolidone on the
enzymatic action of pepsin. FEBS Lett. 9, 194-196
/1970/
23. Flower R.J.: Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis.
Pharmacol. Rev. 26, 33-67 /1974/
24. Gander E.S., Moppert J.M.: Der Einfluss von Dimethylsulfoxid
auf die Permeabilität der Lysosomenmembran bei quan-
titativer und qualitativer Darstellung der sauren
Phosphatase. Histochemie 20, 211-214 /1969/
25. Goldfischer S.: The cytochemical localization of myoglobin
in striated muscle of man and walrus. J. Cell Biol.
34, 398-403 /1967/
26. Goldfischer S., Villaverde H., Forschirm R.: The demonstra-
tion of acid hydrolase, thermostable reduced diphos-
phopyridine nucleotide tetrazolium reductase and
peroxidase activities in human lipofuscin pigment
granules. J. Histochem. Cytochem. 14, 641-652 /1966/
27. Graham R.C., Karnovsky J.: The early stages of absorption
of injected horseradish peroxidase in the proximal
tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemi-
stry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14,
291-302 /1966/
28. Graham R.C., Limpert S., Kellermeyer R.W.: The uptake and
transport of exogenous proteins in mouse liver.
Ultrastructural cytochemical studies with peroxidase
tracers. Lab. Invest. 20, 298-304 /1969/
29. Hamberg M.: Biosynthesis of prostaglandins in the renal
medulla of rabbit. FEBS Lett. 5, 127-130 /1969/
30. Hamberg M., Samuelsson B.: Oxygenation of unsaturated fatty
acids by the vesicular gland of sheep. J. biol. Chem.
242, 5344-5354 /1967/
31. Hamberg M., Samuelsson B.: Detection and isolation of an
endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthe-
sis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 899-903 /1973/

32. Hamberg M., Samuelsson B.: Prostaglandin endoperoxides VII. Novel transformations of arachidonic acid in guinea pig lung. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 61, 942-950 /1974/
33. Hamberg M., Samuelsson B.: Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 3400-3404 /1974/
34. Hanker J.S., Anderson W.A., Bloom F.E.: Osmiophilic polymer generation: catalysis by transition metal compounds in ultrastructural cytochemistry. *Science* 175, 991-993 /1972/
35. Hansson E., Samuelsson B.: Autoradiographic distribution studies of ^3H -labelled prostaglandin E_1 in mice. *Biochim. biophys. Acta* 106, 379-385 /1965/
36. Herzog V., Fahimi H.D.: Cytochemical distinction between catalase and peroxidase. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 288-289 /1974/
37. Herzog V., Fahimi H.D.: The effect of glutaraldehyde on catalase. Biochemical and cytochemical studies with beef liver catalase and rat liver peroxisomes. *J. Cell Biol.* 60, 303-311 /1974/
38. Hinman J.W.: Prostaglandins. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 161-178 /1972/
39. Hirai K.-I.: Specific affinity of oxidized amine dye /radical intermediate/ for heme enzymes: study in microscopy and spectrophotometry. *Acta histochem. cytochem.* 1, 43-55 /1968/
40. Hirai K.-I.: Comparison between 3,3'-diaminobenzidine and auto-oxidized 3,3'-diaminobenzidine in the cytochemical demonstration of oxydative enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* 19, 434-442 /1971/
41. Hirai K.-I.: Diaminobenzidine in cytochemistry. *Acta histochem. cytochem.* 8, 31-40 /1975/

42. Janszen F.H.A., Nugteren D.H.: Histochemical localization of prostaglandin synthetase. *Histochemie* 27, 159-164, /1971/
43. Janszen F.H.A., Nugteren D.H.: A histochemical study of the prostaglandin biosynthesis in the urinary system of rabbit, guinea pig, gold hamster and rat. *Adv. Biosci.* 9, 287-292 /1973/
44. Jouvenaz G.H., Nugteren D.H., Beerthuis R.K., Van Dorp D.: A sensitive method for the determination of prostaglandins by gas chromatography with electron-capture detection. *Biochim. biophys. Acta* 202, 231-234 /1970/
45. Karnovsky M.J., Rice D.F.: Exogenous cytochrome c as nan ultrastructural tracer. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 751-753 /1969/
46. Kuehl F.A.: Prostaglandins, cyclic nucleotides and cell function. *Prostaglandins* 5, 325-340 /1974/
47. Kunze H., Vogt W.: Significance of phospholipase A for prostaglandin formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 123-125 /1971/
48. La Hann T.R., Horita A.: Effects of dimethyl sulfoxide /DMSO/ on prostaglandin synthetase. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 18, 81-82 /1975/
49. Lands W., Lee R., Smith W.: Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 107-119 /1971/
50. Lands W., Le Tellier P.R., Rome L.H., Vanderhoek J.Y.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Adv. Biosci.* 9, 15-28 /1972/
51. Landolt R., Shaw S.M., Vetter R.J., Cheh S.-H.: An autoradiographic study of prostaglandin E₁ and/or its metabolites in mouse kidney tissue. *Prostaglandins* 5, 305-312 /1974/
52. Larsson C., Anggård E.: Regional differences in the formation and metabolism of prostaglandins in the rabbit kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 21, 30-36 /1973/

53. Lerman R.J., Pitcock J.A., Stephenson P., Muirhead E.E.: Interstitial cell tumour /formerly fibroma of renal medulla/. Human Pathol. 3, 559-568 /1972/
54. Makita T., Sandborn E.B.: Fine structural localization of reductases and transferases in muscle mitochondria and the effect of dimethyl sulfoxide /DMSO/ in the incubation medium. J. Histochem. Cytochem. 18, 686 /1970/
55. Makita T.; Sandborn E.B.: Effect of DMSO in incubation medium for cytochemical localization. Histochemie 26, 305 /1971/
56. Mandal A.K., Frohlich E.D., Chrysant K., Pfeffer M.A., Yunice A., Nordquist J.A.: Ultrastructural analysis of renal papillary interstitial cell of spontaneously hypertensive rats. J. lab. clin. Med. 83, 256-262 /1974/
57. Margoliash E., Novogrodsky A., Schejter A.: Irreversible reaction of 3-amino,1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. Biochem. J. 74, 339-348 /1960/
58. Miyamoto T.: Prostaglandin synthetase system: resolution into oxygenase and isomerase component. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3645-3648 /1974/
59. Monga G., Canese M.G., Bussolati G.: Electron microscopical demonstration of sulphated mucopolysaccharides in mouse tracheal cartilage with a diaminobenzidine-osmium tetroxide technique. Histochem. J. 4, 205-211 /1972/
60. Moriarty G.C.: Adenohypophysis: ultrastructural cytochemistry. A review. J. Histochem. Cytochem. 21, 855-894 /1973/
61. Muehrcke R.C., Mandal A.K., Epstein M., Volini F.I.: Cytoplasmic granularity of renal medullary interstitial cells in experimental hypertension. J. lab. clin. Med. 73, 299-306 /1969/

62. Muirhead E.E., Germain G.S., Leach B.E., Brooks B., Stephenson P.: Renomedullary interstitial cells /RIC/, prostaglandins /PG/ and the antihypertensive function of the kidney. Prostaglandins 3, 581-594 /1973/
63. Muirhead E.E., Germain G.S., Leach B.E., Pitcock J.A., Stephenson P., Brooks B., Brosius W.L., Daniels E.G., Hinman J.W.: Production of renomedullary prostaglandins by renomedullary interstitial cells grown in tissue culture. Circ. Res. 31, /Suppl. II/, 161-172 /1972/
64. Nakano J.: Tissue distribution and subcellular localization of ^3H -prostaglandin E_1 in rats and dogs. Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 187, 106-119 /1970/
65. Nekrasova A.A., Sokolova R.I., Lantsberg L.A.: Prostaglandin-like renal vasodepressor lipids and electrolyte exchange in the kidney. Adv. Biosci. 9, 307-312 /1972/
66. Nir I., Seligman A.M.: Photooxidation of diaminobenzidine /DAB/ by chloroplast lamellae. J. Cell Biol. 46, 617-620 /1970/
67. Nissen H.M.: On lipid droplets in renal interstitial cells. I. A histochemical study. Z. Zellforsch. 83, 76-81 /1967/
68. Nissen H.M.: On lipid droplets in renal interstitial cells. II. A histochemical study on the number of droplets in salt-depletion and acute salt-repletion. Z. Zellforsch. 85, 483-491 /1968/
69. Nissen H.M.: On lipid droplets in renal interstitial cells. III. A histological study on the number of droplets during hydration and dehydration. Z. Zellforsch. 92, 52-61 /1968/
70. Nissen H.M., Andersen H.: On the localization of a prostaglandin dehydrogenase activity in the kidney. Histochemie 14, 189-200 /1968/

71. Nissen H.M., Andersen H.: On the activity of a prostaglandin dehydrogenase system in the kidney. A histochemical study during hydratation/dehydration and salt repletion/salt depletion. *Histochemie* 17, 241-247 /1969/
72. Nissen H.M., Bojesen I.: On lipid droplets in renal interstitial cells. IV. Isolation and identification. *Z. Zellforsch.* 97, 274-284 /1969/
73. Novikoff A.B.: Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles of rat liver. *Symp. Soc. exp. Biol.* 10, 92-109 /1957/
74. Novikoff A.B., Beard M.E., Abala A., Sheid B., Quintana N., Biempica L.: Localization of endogenous peroxidases in animal tissues. *J. Microsc. /Paris/* 12, 381-404 /1971/
75. Novikoff A.B., Biempica L., Beard M.E., Dominitz R.: Visualization by diaminobenzidine for norepinephrine cells and premelanosomes. *J. Microsc. /Paris/* 12, 297-302 /1971/
76. Novikoff A.B., Goldfischer S.: Visualization of peroxisomes /microbodies/ and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 675-680 /1969/
77. Novikoff A.B., Novikoff P.M., Davies C., Quintana N.: Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 1006-1022 /1972/
78. Nugteren D.H.: Arachidonate lipoxydase in blood platelets. *Biochim. biophys. Acta* 380, 299-307 /1975/
79. Nugteren D.H., Hazelhof E.: Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim. biophys. Acta* 326, 448-461 /1973/
80. Pace-Asciak C.: Prostaglandin synthetase activity in the rat stomach fundus. Activation by L-norepinephrine and related compounds. *Biochim. biophys. Acta* 280, 161-171 /1972/

81. Pace-Asciak C., Wolfe L.S.: Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoleic and linolenic acids. *Biochim. biophys. Acta* 152, 784-787 /1968/
82. Panganamala R.V., Sharma H.M., Sprecher H., Geer J.C., Cornwell D.G.: A suggested role for hydrogen peroxide in the biosynthesis of prostaglandins. *Prostaglandins* 8, 3-11 /1974/
83. Parkes D.G., Eling T.E.: Characterization of prostaglandin synthetase in guinea pig lung. Isolation of a new prostaglandin derivative from arachidonic acid. *Biochemistry* 12, 2598-2604 /1974/
84. Pearse A.G.E.: *Histochemistry theoretical and applied*. Vol.1. J.A.Churchill Ltd., London 1968.
85. Penney D.P., Olson J., Marinetti G.V., Vaala S., Averill K.: Localization of tritiated prostaglandin E₁ in rat adrenal cortices. *Z. Zellforsch.* 146, 309-317 /1973/
86. Perez G., McGuckin C.: Cellular localization of prostaglandin A₂ in the rat kidney. *Prostaglandins* 2, 393-398 /1972/
87. Prezyna A., Attallah A., Vance K., Schoolman M., Lee J.: The renomedullary body. A newly recognized structure of renomedullary cell origin associated with high prostaglandin content. *Prostaglandins* 3, 669-678 /1973/
88. Reith A., Schüller B.: Heterogeneity of rat liver mitochondria as indicated by differential cytochrome oxidase activities. *J. Ultrastruct. Res.* 38, 206 /1972/
89. Reith A., Schüller B.: Demonstration of cytochrome oxidase activity with diaminobenzidine: a biochemical and electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 583-589 /1972/
90. Rembiesa R., Warchol A.: The influence of pH on the conversion of arachidonic acid to PGF₂ by bovine seminal vesicles microsomes /BSVM/. *Prostaglandins* 4, 441-442 /1973/

91. Roels F.: Cytochrome C and cytochrome oxidase in diaminobenzidine staining of mitochondria. J. Histochem. Cytochem. 22, 442-444 /1974/
92. Roels F., Wisse E., De Prest B., Van der Meulen J.: Cytochemical discrimination between catalases and peroxidases using diaminobenzidine. Histochemistry 41, 281-312 /1975/
93. Rose A.J., Collins A.J.: The effect of pH on the production of prostaglandins E_2 and F_2 and a possible pH-dependent inhibitor. Prostaglandins 8, 271-283 /1974/
94. Rynd J.A., Reddy B.K., Gibian M.J.: Differential assays and effects of selected inhibitors on prostaglandin /PG/ synthetase. Fed. Proc. 33, 1506 /1974/
95. Samuelsson B.: On the incorporation of oxygen in the conversion of 8,11,14-eicosatrienoic acid to prostaglandin E_1 . J. Am. Chem. Soc. 87, 3011-3019 /1965/
96. Samuelsson B.: Biosynthesis of prostaglandins. Fed. Proc. 5, 1442-1450 /1972/
97. Saunders B.C., Holmes-Siedle A.G., Stark B.P.: Peroxidase. Butterworths, London 1964.
98. Scarpelli D.G., Pearse A.G.E.: Physical and chemical protection of cell constituents and the precise localization of enzymes. J. Histochem. Cytochem. 6, 369-376 /1958/
99. Seligman A.M., Karnovsky M.J., Wasserkrug H.L., Hanker J.S. Non-droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmophilic reagent, diaminobenzidine /DAB/. J. Cell Biol. 38, 1-14 /1968/
100. Siggins G., Hoffer B., Bloom F.: Prostaglandin-norepinephrine interactions in brain. Microelectrophoretic and histochemical correlates. Ann. N.Y. Acad. Sci. 180, 302-323 /1971/

101. Sih C.J., Takeguchi C., Foss P.: Mechanism of prostaglandin biosynthesis. III. Catecholamines and serotonin as coenzymes. J. Am. Chem. Soc. 92, 6670 /1970/
102. Smith W.L., Lands W.: Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis. J. biol. Chem. 246, 6700-6704 /1971/
103. Smith W.L., Lands W.: Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. Biochemistry 11, 3276-3285 /1972/
104. Straus W.: Use of horseradish peroxidase as a marker protein for studies of phagolysosomes, permeability and immunology. W: Methods and achievements of pathology. Red. E. Bajusz, G. Jasmin. Vol 4. S. Karger AG, Basel 1969, str. 54-91.
105. Takeguchi C., Kohno E., Sih C.J.: Mechanism of prostaglandin biosynthesis. I. Characterization and assay of bovine prostaglandin synthetase. Biochemistry 10, 2372-2376 /1971/
106. Tappel A.L.: Lipid peroxidation damage to cell components. Fed. Proc. 32, 1870-1874 /1973/
107. The Prostaglandins. Vol.1. Red. P.W. Ramwell. Plenum Press, New-York-London, 1973.
108. Vane J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature new Biol. 231, 232-235 /1971/
109. Wallach D.P., Daniels E.G.: Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from sheep seminal vesicles. Biochim. biophys. Acta 231, 445-457 /1971/
110. Weeks J.R.: Prostaglandins. Ann. Rev. Pharmacol. 12, 317-336 /1972/
111. Wlodawer P., Samuelsson B.: On the organization and mechanism of prostaglandin synthetase. J. biol. Chem. 248, 5673-5678 /1973/

112. Ziboh V.A.: Biosynthesis of prostaglandin E₂ in human skin: subcellular localization and inhibition by unsaturated fatty acids and anti-inflammatory drugs. J. Lipid Res. 14, 377-384 /1973/
-

ILUSTRACJE

Ryc. 1-4. Nieswoista reakcja zachodząca w nieobecności kwasu arachidonowego, w wyniku inkubacji wg Janszena i Nugterena /42/.

Skład płynu inkubacyjnego: DAB 0,5 mg/ml, KCN 1 mM, bufor Tris/HCl pH 8,0. Czas inkubacji 2 h 30 min.

Ryc. 1. Nerka królika.

A. Strefa korowa, widoczna dodatnia reakcja wekanalikach głównych i wybitnie dodatnia reakcja we wstawkach. Obszar ciałek nerkowych nie wykazuje obecności produktu reakcji. X 130

B. Strefa rdzenia zewnętrznego, widoczna silnie dodatnia reakcja na terenie ramion szerokich pętli Henlego oraz dodatnia reakcja w niektórych komórkach cewek zbiorczych /strzałka/. X 130

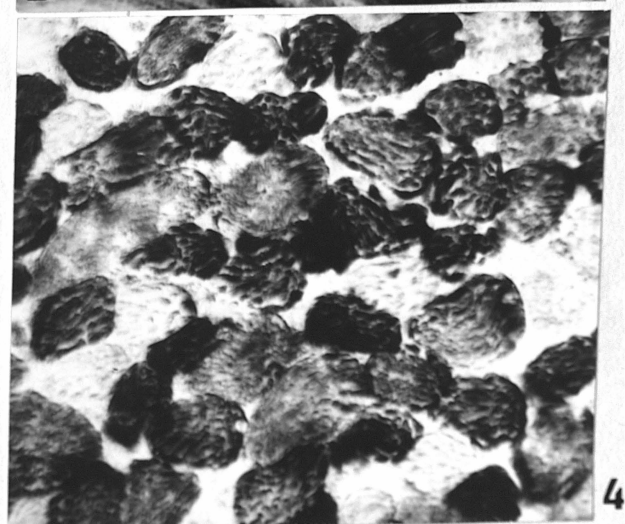
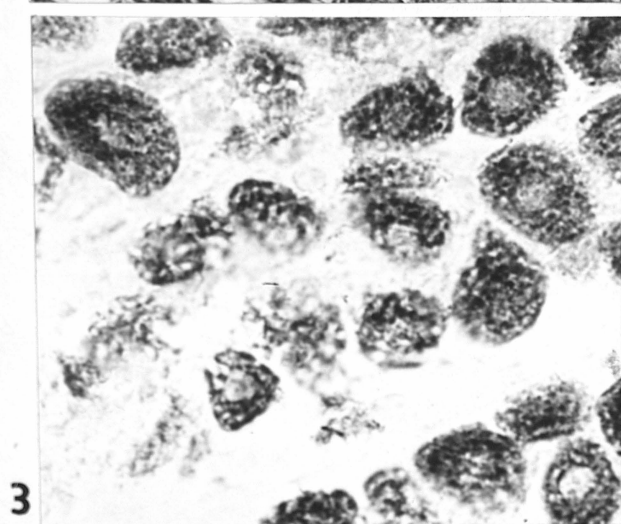
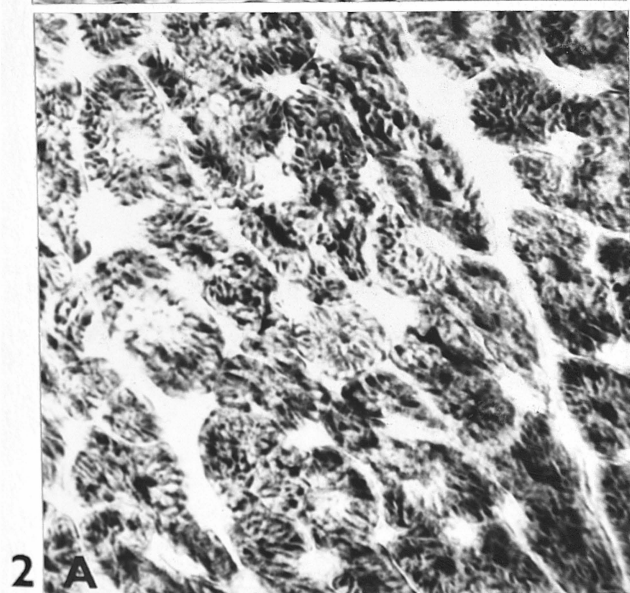
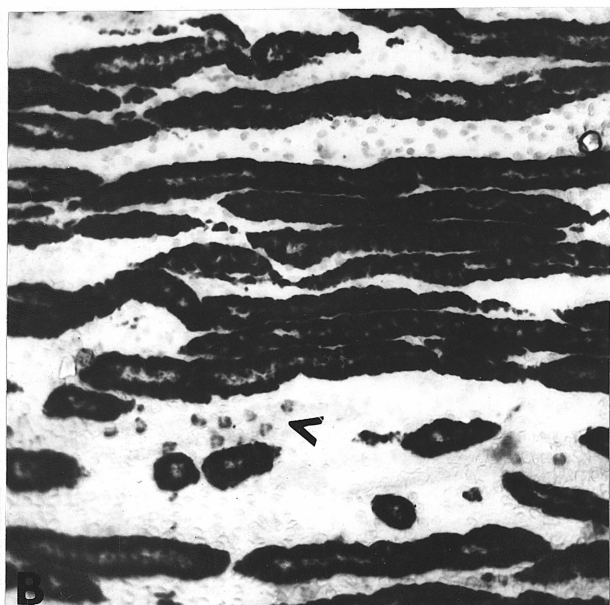
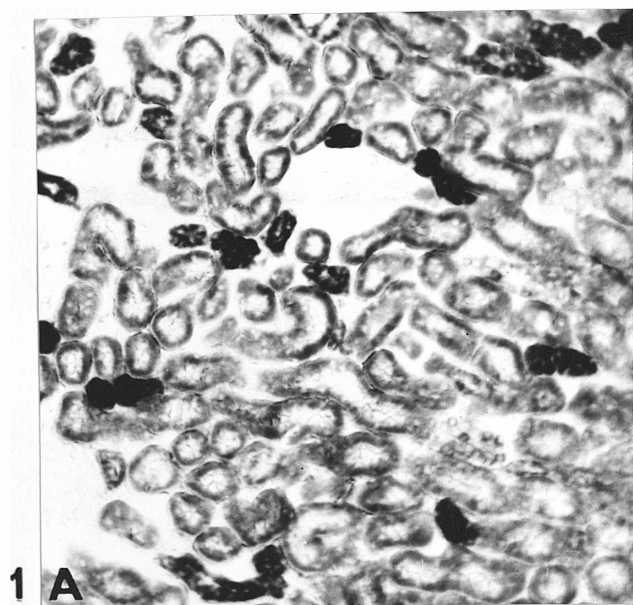
Ryc. 2. Mięsień sercowy królika.

A. Przekrój poprzeczny, uwidoczniony ziarnisty charakter reakcji. X 560

B. Przekrój podłużny, pozytywnie reagujące struktury ułożone w postaci kolumn równoległych do długiej osi włókien. X 560

Ryc. 3. Błona śluzowa żołądka królika. Silnie dodatnio reagujące komórki okładzinowe. X 560

Ryc. 4. Mięsień okoruchowy szczura. Rozmieszczenie reagujących elementów podobne jak w m. sercowym. Widoczna niejednolita reaktywność poszczególnych włókien mięśniowych. X 560



Ryc. 5. Reakcja nieswoista, jak na Ryc. 1-4. Mięsień sercowy szczura. Wpływ inhibitorów obecnych w płynie inkubacyjnym.

A. Reakcja kontrolna. X 560

B. 5 mM KCN. X 130

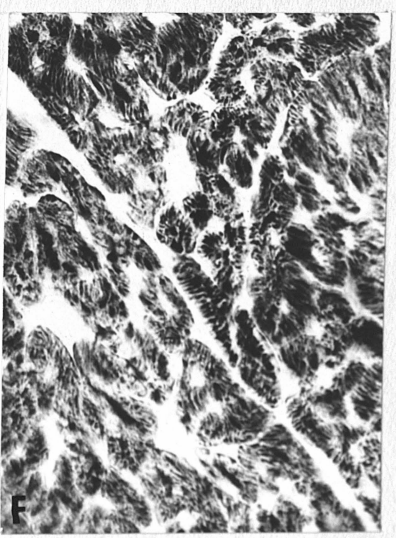
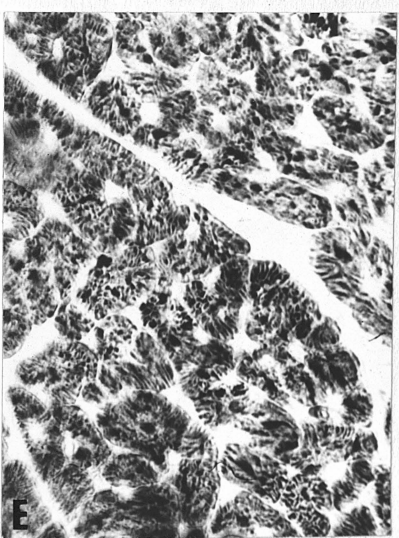
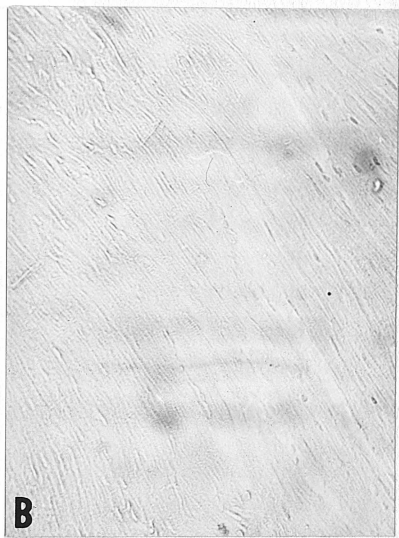
C. 5 mM NaN_3 . X 130

D. 5 mM NaF. X 260

E. 10 mM aminotriazol. X 260

F. 1 mM indometacyna. X 260

Całkowite zahamowanie reakcji przez KCN i NaN_3 ,
osłabienie intensywności reakcji pod wpływem
NaF.



Ryc. 6-7. Wpływ protekcji osmotycznej na reakcje tkanek z DAB.

Ryc. 6 A-C. Nerka królika, nieutrwalana. Skład płynu inkubacyjnego: DAB 0,5 mg/ml, bufor Tris/HCl pH 7,4 z dodatkiem:

A: 7,5% sacharozy,

B: 0,9% NaCl,

C: 7,5% PVP.

Brak reakcji w tkankach inkubowanych w obecności NaCl i PVP. X 130

Ryc. 6D. Nerka królika, nieutrwalana. Skład płynu inkubacyjnego: DAB 0,5 mg/ml, bufor Tris/HCl pH 7,4, cytochrom c 1 mg/ml, 0,9% NaCl. Silnie dodatnia reakcja pomimo obecności NaCl.

Ryc. 7. Nerka królika, utrwalana w 2,5% aldehydzie glutarowym przez 18 h. Reakcja z utlenioną DAB wg Hirai /40/, płyn inkubacyjny z dodatkiem:

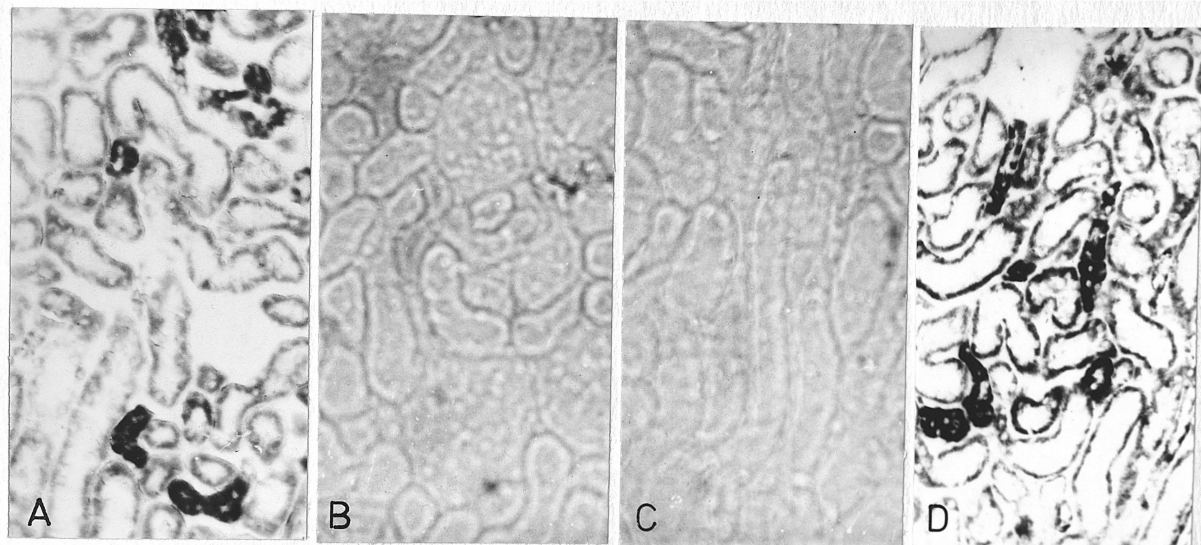
A: 7,5% sacharozy,

B: 0,9% NaCl,

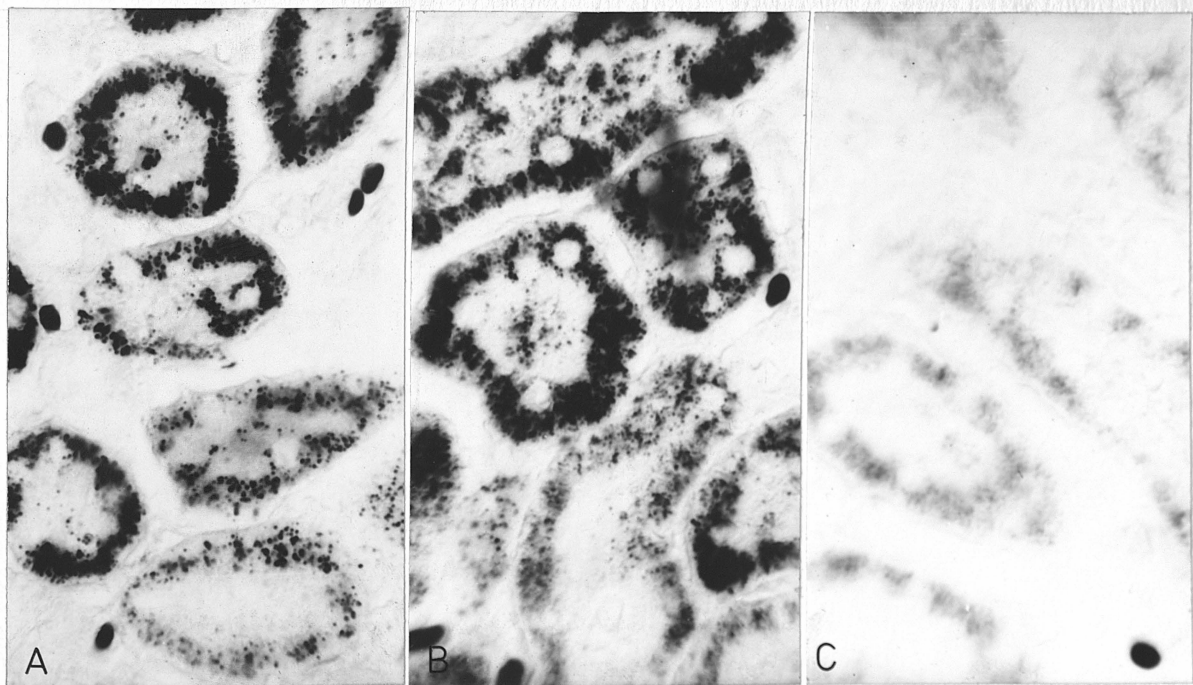
C: 7,5% PVP.

Silnie dodatnia reakcja o wyraźne mitochondrialnej lokalizacji w tkankach inkubowanych w obecności sacharozy i NaCl, reakcja na granicy uchwytności optycznej w tkance inkubowanej w obecności PVP. X 560

6



7



Ryc. 8-9. Reakcja zależna od obecności kwasu arachidonowego w płynie inkubacyjnym.

Skład płynu: DAB 0,5 mg/ml, kwas arachidonowy 1 mM, KCN 5 mM, bufor Tris/HCl pH 8,0.

Ryc. 8. Nerka królika, nieutrwalana.

A. Reakcja w cewkach zbiorczych na terenie rdzenia. X 130

B;C: Przekrój poprzeczny i podłużny przez cewkę zbiorczą wykazuje jednakową reaktywność wszystkich komórek ściany. X 560

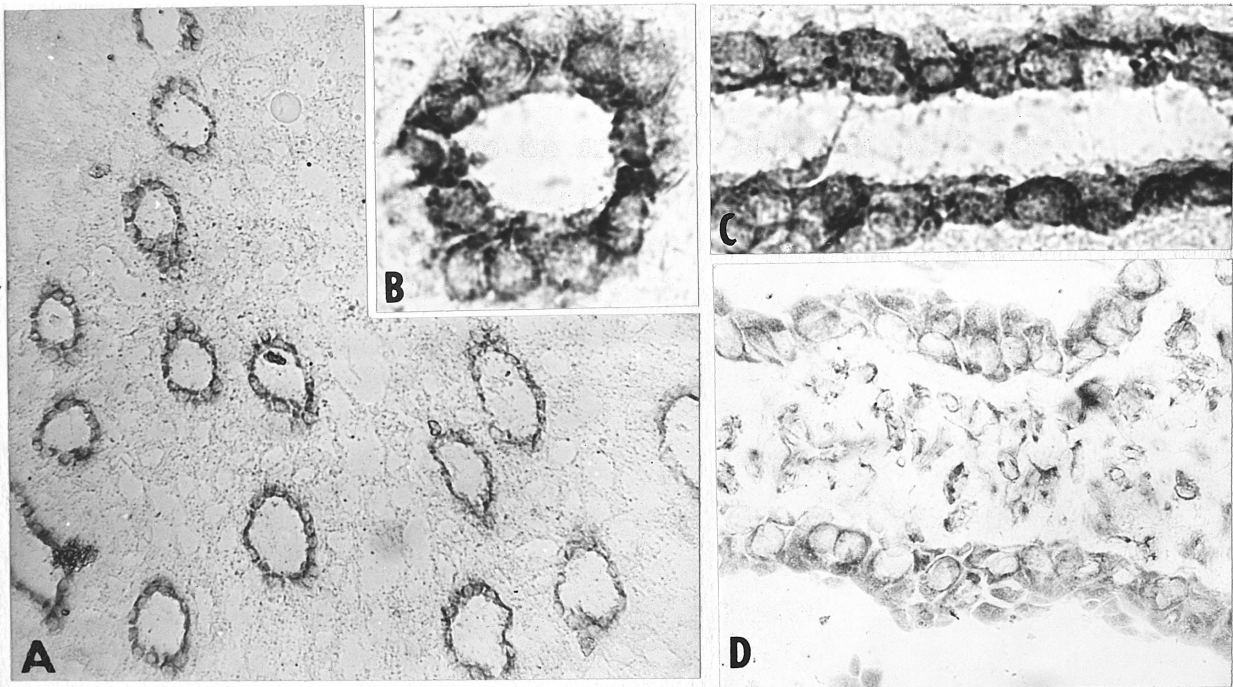
D. Okolice brodawki, pozytywna reakcja w komórkach śródmiąższowych. X 260

Ryc. 9. Pęcherzyki nasienne tryka, nieutrwalane.

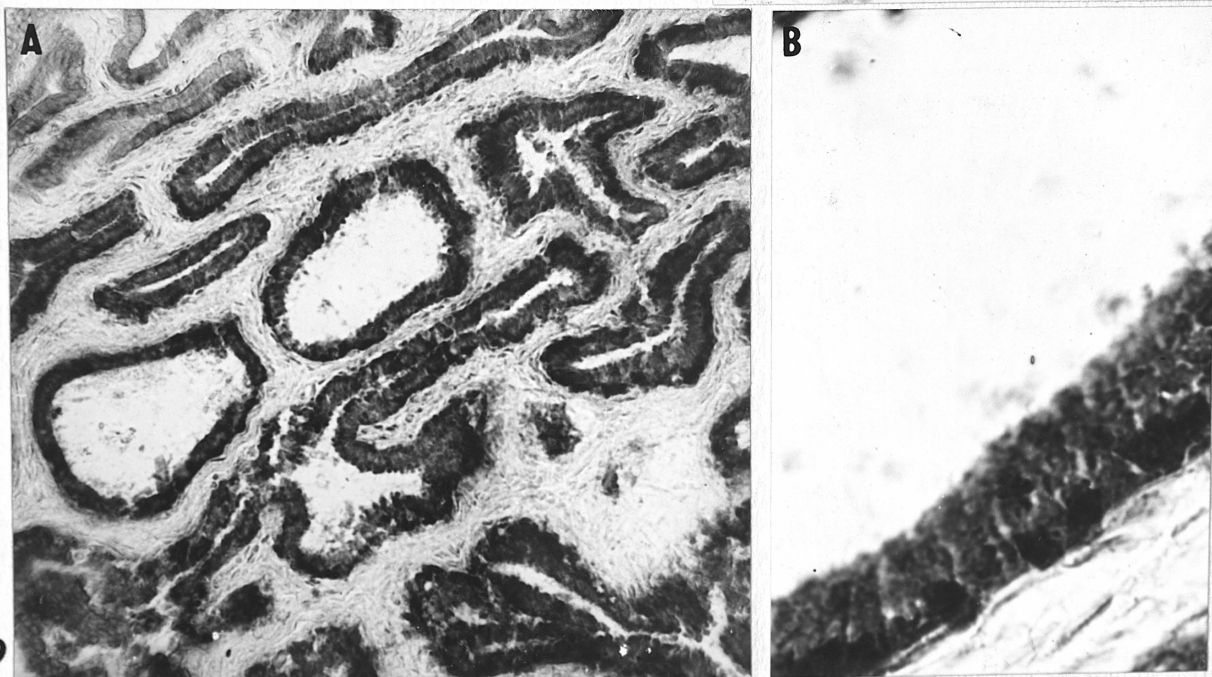
A. Reakcja w komórkach nabłonka gruczołowego. X 130

B. Silniejsze powiększenie, demonstrujące wyraźniej zaznaczoną reakcję na terenie błony jądrowej. X 560

8



9



Ryc. 10. Wpływ protekcji osmotycznej na reakcję zależną od kwasu arachidonowego.

Nerka królika, nieutralana. X 130

A. Reakcja w obecności 7,5% sacharozy.

B. Zahamowanie reakcji w obecności 7,5% PVP.

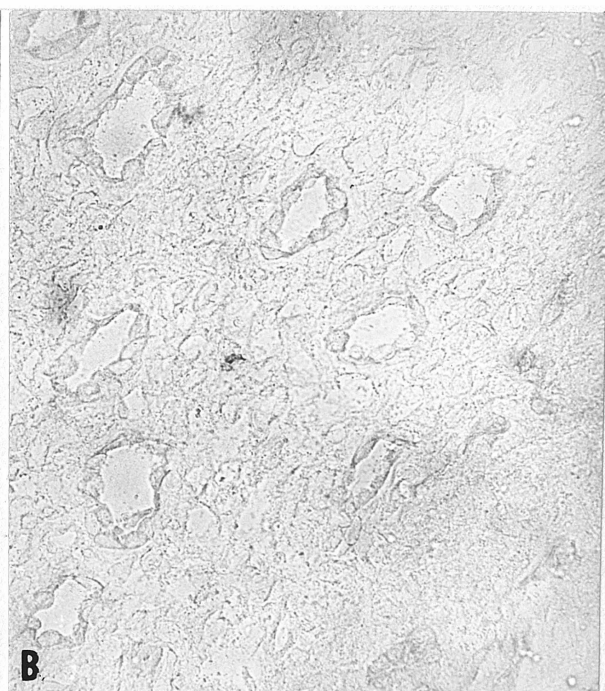
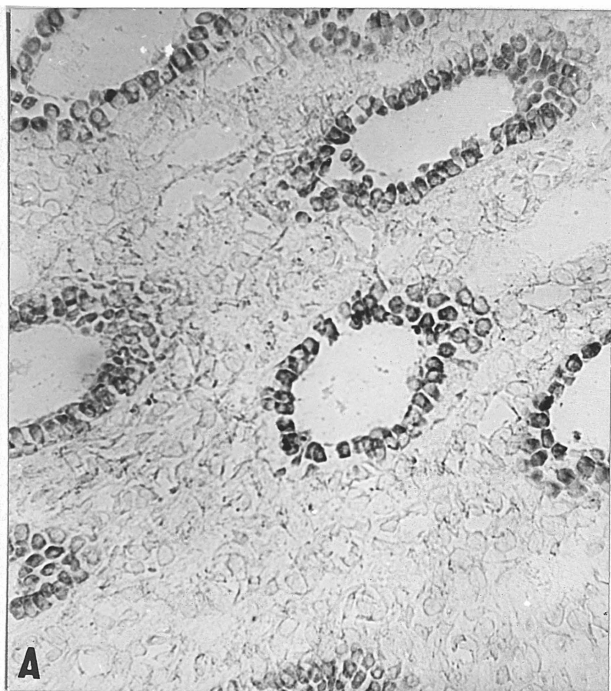
Ryc. 11. Wpływ DMSO na reakcję zależną od kwasu arachidonowego.

Pęcherzyki nasienne tryka, nieutralane. X 130

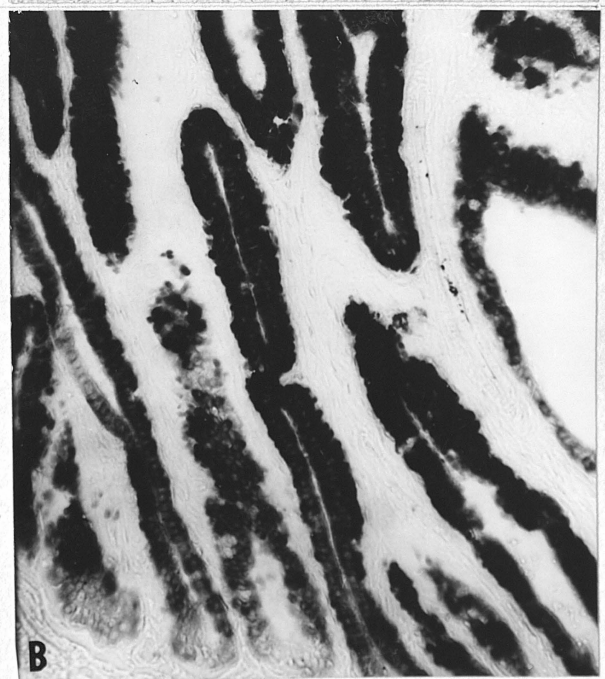
A. Reakcja kontrolna.

B. Reakcja w obecności 2% DMSO w płynie inkubacyjnym, widoczne wzmożenie intensywności reakcji.

10



11



Ryc. 12. Wpływ inhibitorów obecnych w płynie inkubacyjnym na reakcję zależną od kwasu arachidonowego. Nerka królika, nieutrwalana.

- A. Reakcja kontrolna. X 130
- B. 10 mM KCN. X 260
- C. 10 mM NaF. X 130
- D. 10 mM NaN_3 . X 260
- E. 1 mM indometacyna. X 260
- F. 10 mM kwas mefenamowy. X 260
- G. 25 mM kwas acetylosalicylowy. X 260
- H. 10 mM aminotriazol. x 130

Jedynie aminotriazol powoduje zahamowanie reakcji.

Ryc. 13. Efekty użycia "fałszywych" substratów, zastępujących kwas arachidonowy w płynie inkubacyjnym.

Pęcherzyki nasienne trąka, nieutrwalane. Poza buforem, KCN i DAB płyn inkubacyjny zawierał:

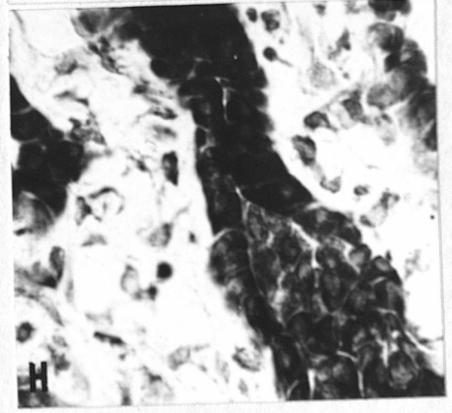
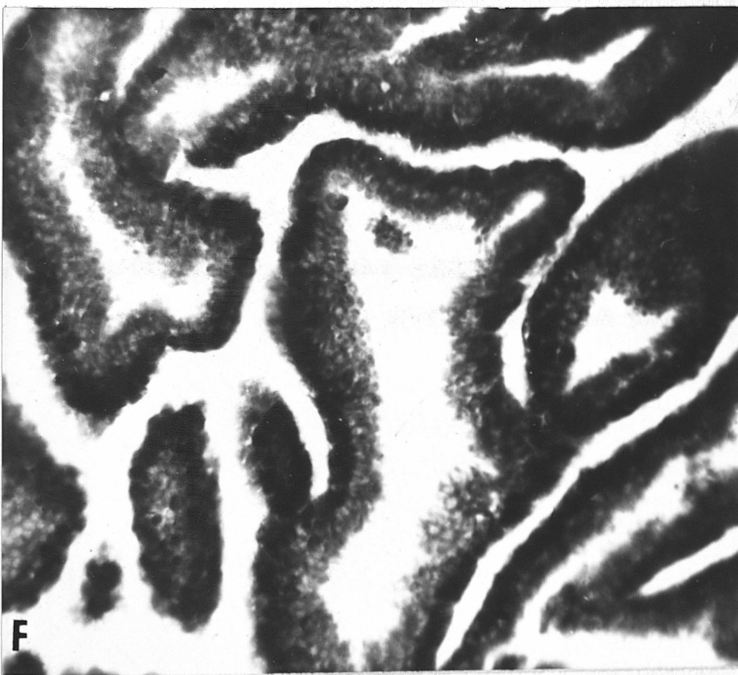
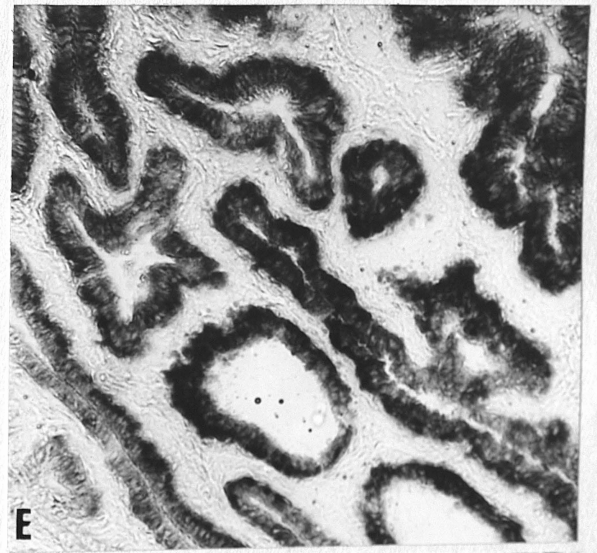
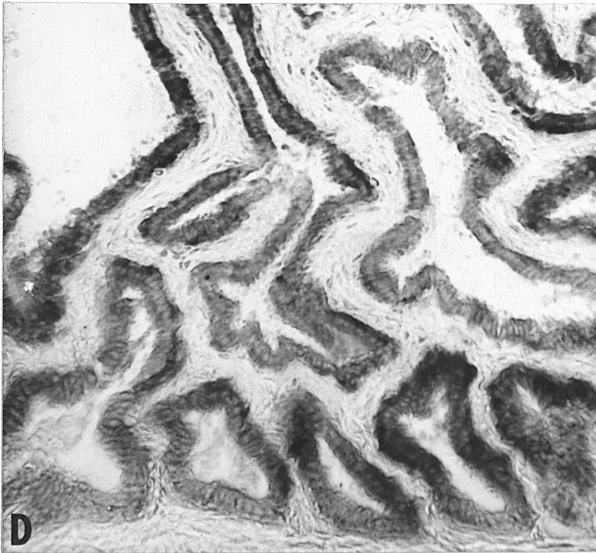
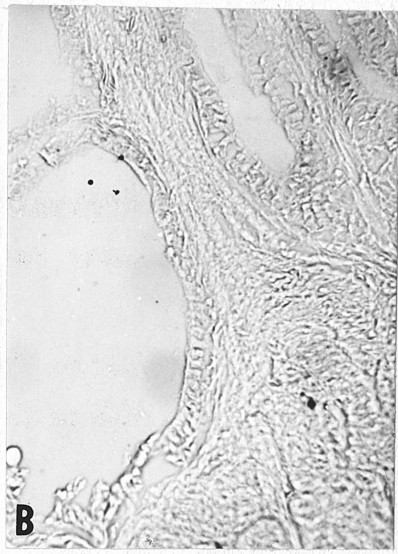
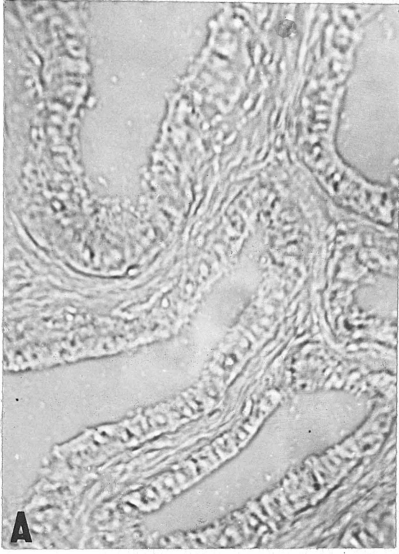
- A. 3 mM kwas palmitynowy. X 130
- B. 3 mM kwas olejowy. X 130
- C. 3 mM kwas linolowy. X 130
- D. 3 mM kwas linolenowy. X 130
- E. 3 mM kwas arachidonowy. X 130

F, G, H. 0,003% H_2O_2 .

G, H: reakcja w cewkach zbiorczych i komórkach śródmiąższowych nerki królika.

F: X 260; G: X 560; H: X 260

Widoczna pozytywna reakcja o stopniowo wzrastającej intensywności przy zastosowaniu w charakterze substratu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o wzrastającej liczbie wiązań nienasyconych /kw. linolowy, linolenowy, arachidonowy/ oraz wybitnie intensywną reakcję przy użyciu H_2O_2 jako substratu - reakcja ta wykazuje tę samą lokalizację w pęcherzykach nasennych oraz na terenie nerki, co reakcja zależna od kwasu arachidonowego.



Ryc. 14. Wpływ katalazy /300 ug/ml/ dodanej do płynu inkubacyjnego na reakcje zależne od nienasyconych kwasów tłuszczowych i H_2O_2 .
Nerka królika, nieutrwalana.

Użyte substraty:

- A. 3 mM kwas linolowy. X 260
- B. 3 mM kwas linolenowy. X 260
- C. 3 mM kwas arachidonowy. X 260
- D. 0,003% H_2O_2 . X 130

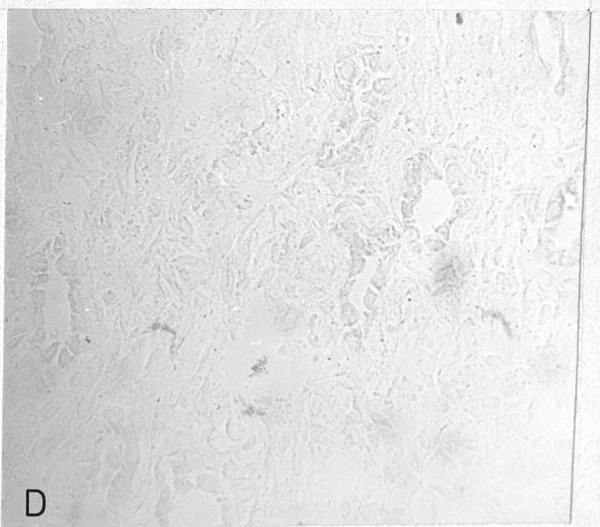
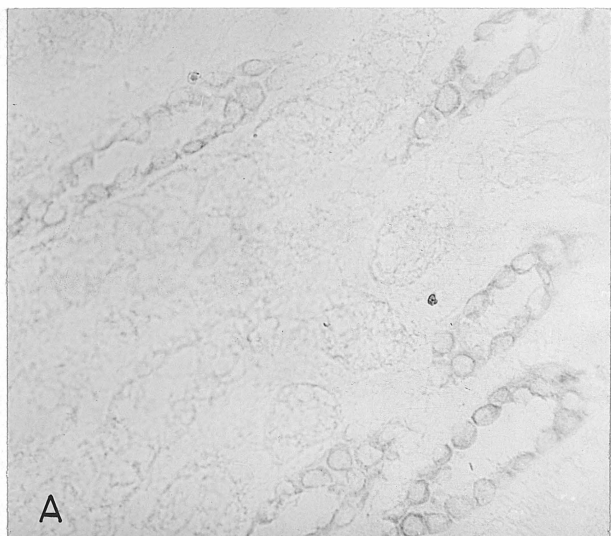
Katalazą zapobiega wystąpieniu reakcji jedynie w przypadku użycia H_2O_2 w charakterze substratu.

Ryc. 15. Wpływ niektórych kofaktorów biosyntezy prostaglandyn obecnych w płynie inkubacyjnym na reakcję zależną od kwasu arachidonowego.

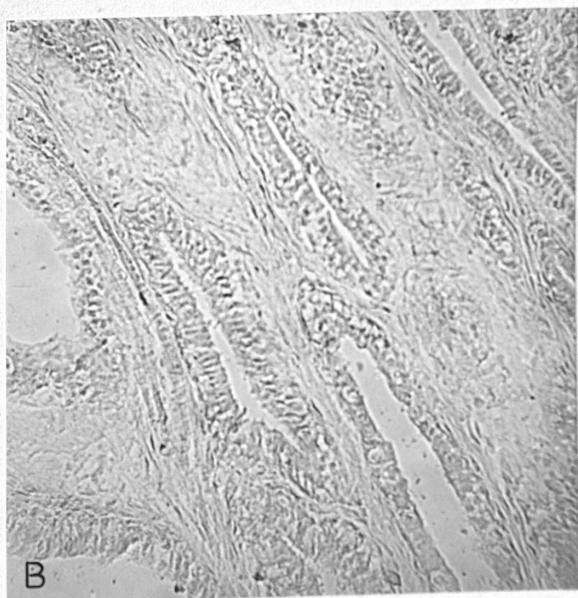
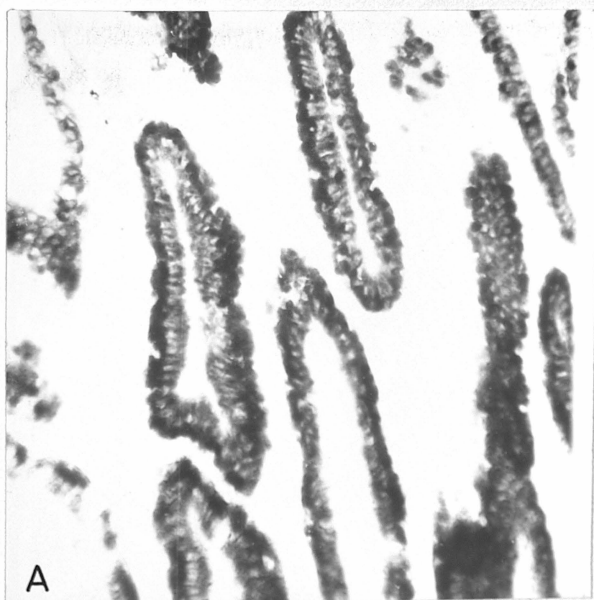
- A. 10 mM zredukowany glutation /GSH/ - brak wpływu na reakcję.
- B. 10 mM hydrochinon - zahamowanie reakcji.

X 130

14



15



Ryc. 16. Ultrastrukturalna lokalizacja reakcji nieswoistej zachodzącej w nieobecności kwasu arachidonowego przy zastosowaniu płynu inkubacyjnego zawierającego 0,5 mg/ml DAB i bufor Tris/HCl pH 8,0.

Produkt reakcji obecny w przestrzeniach międzybłonistych i wewnątrzgrzebieniowych mitochondriów:

A. w komórce roboczej mięśnia sercowego królika

X 16 000

B. w komórce okładzinowej błony śluzowej żołądka królika. X 12 000.

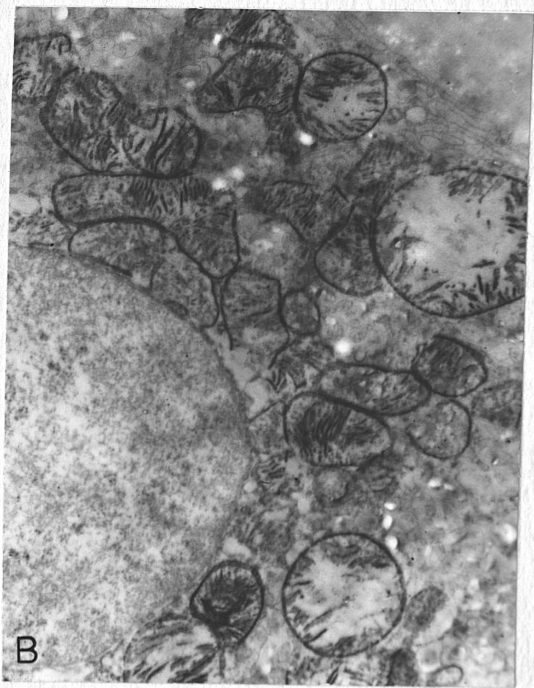
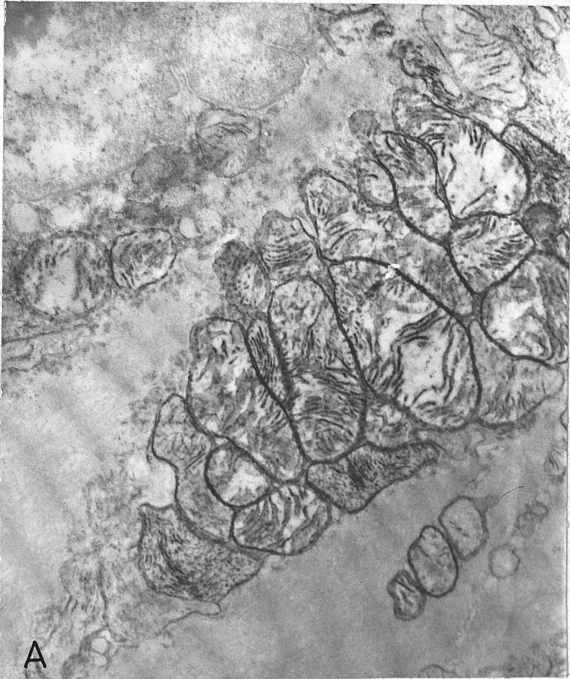
/Tkanki nieutrwalane/.

Ryc. 17. Elektronogram komórek cewek zbiorczych rdzenia nerki królika /tkanka nieutrwalana/.

Reakcja zależna od kwasu arachidonowego.

Skąpy produkt reakcji zlokalizowany jest na błonach osłonki jądrowej i siateczki śródplazmatycznej /strzałka/. X 20 000

16



17

